

**Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*,
patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma
harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología,
actividad enzimática y molecular**

Marina Celeste Stocco

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales

Directora: Dra. Cristina A. Cordo

Co directora: Dra. Mónica M. Steciow



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencia Naturales y Museo

A mis padres

**“Siempre parece imposible
hasta que se hace”**

Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, al CONICET y a la CIC por su financiamiento

A La Dra Salerno directora del Instituto de Biodiversidad y Biotecnología INBIOTEC-CONICET de Mar del Plata y la Dra Fabiana Consolo por darme la posibilidad de aprender con ellas.

A mi hermano y a Rossana por estar siempre a mi lado.

A Sergio por su tiempo, paciencia y su colaboración.

A la cátedras de Cereales, Microbiología y Terapeuticas de la FCAYF por hacer posibles mis ensayos.

A mi directora Cristina por su optimismo, por trasmitirme tanto amor por lo que hace y por su inagotable paciencia.

A mi codirectora Mónica por su buena predisposición.

A Cecilia Mónaco por su generosidad, por tenerme en cuenta para cada proyecto, curso y trabajo que emprende, por dejarme crecer profesionalmente y sobre todo por su amistad.

A los que compartieron risas, charlas, lágrimas durante los largos días de ensayos y evaluaciones Naty, Cecilia A., Gladys L. y Nicolás D.

A mis compañeras y compañeros del CIDEFI Elena, Lía, Marina, Cristina, Silvina, Silvia, Jorgelina, Ismael y Pedro por las charlas en los almuerzo, por escucharme y aconsejarme durante estos años.

A mis amigos de la vida Ro, Sandra, Lu, Ariel; a mis amigos de la Facu Edu, Lili, Mere Vane, Trini, Sabri, Tere, Sole, Pancho, Clau, Julito, Alfon; a mis primos Ceci, Negra, Hugo; a mis amigos del laboratorio Ceci, Pepe, Romi, Pau, Ale y Nadia porque siempre creyeron en mí y me acompañaron durante esta etapa.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRAC	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	
1. El cultivo de trigo.....	5
1.1 Origen del trigo	5
1.1.1 Geográfico	5
1.1.2 Genético.....	5
1.2 Evolución de los rendimientos y de la superficie sembrada en Argentina.....	6
1.3 Usos del trigo en Argentina	8
1.4 Subregiones ecológicas de la región triguera argentina	9
2 Interacción Patógeno–Hospedante	12
2.1 Enfermedades foliares del trigo en la Argentina	12
2.2 La mancha de la hoja de trigo	13
2.2.1 Importancia económica	13
2.2.2 El agente causal	13
2.2.3 Especialización fisiológica del patógeno	15
2.2.4 Adaptación del patógeno a las gramíneas hospedantes.....	17
2.2.5. Actualización filogenética del genero <i>Septoria</i>	18
2.2.6 Sintomatología	20
2.2.7 Ciclo biológico de la enfermedad	21
3. Manejo de la enfermedad	23
3.1. Prácticas culturales.....	25
3.2. Control químico.....	27
3.3. Resistencia genética	29
3.4. Control biológico	30

4. Hongos biocontroladores: Género <i>Trichoderma</i>	31
4.1 Clasificación taxonómica.....	32
4.2 Ecología.....	35
4.3. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control	
Biológico.....	36
4.3.1. Micoparasitismo	36
4.3.2 Antibiosis.....	38
4.3.3 Fungistasis.....	39
4.3.4 Competencia por nutrientes o nichos	40
4.3.5 Promoción del crecimiento de las plantas	41
4.3.6 Inducción de mecanismos de resistencia en planta.....	42
4.3.6.1 Actividad inmunológica en la planta	44
4.4 <i>Trichoderma harzianum</i>	47
5. Situación actual del biocontrol de <i>Mycosphaerella graminicola</i> (teleomorfo de <i>Septoria tritici</i>) en Argentina.....	48
OBJETIVO GENERAL	50
HIPÓTESIS RELEVANTES.....	51
CAPÍTULO I SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma</i> SPP.	
1. Introducción	52
1.1 Objetivos.....	55
2. Materiales y Métodos.....	55
2.1. Obtención de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	56
2.2. Técnicas de conservación de las cepas	56
2.3. Obtención de monospóricos.....	57
2.4. Aislamientos y producción de inóculo de <i>S. tritici</i>	58
Stocco, M.C. 2014	II

2.5. Actividad biocontroladora de aislamientos seleccionados de <i>Trichoderma</i> frente al agente causal de la MHT	58
3. Resultados.....	61
3.1. Obtención de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.....	61
3.2. Técnicas de conservación de las cepas	61
3.3. Actividad biocontroladora de aislamientos seleccionados de <i>Trichoderma</i> frente al agente causal de la MHT	62
3.4. Capacidad biocontroladora de los mejores aislamientos <i>Trichoderma</i> spp.	72
4. Discusión	76

CAPÍTULO II CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS DE *Trichoderma harzianum*

1. Introducción	80
1.1 Objetivos.....	81
1.2 Identificación específica a través de regiones conservadas del ADN	81
1.3 Variabilidad genética intraespecífica	84
2. Materiales y métodos.....	85
2.1 Acondicionamiento del micelio	85
2.2 Extracción de ADN.....	86
2.3 Amplificación por PCR para la identificación específica de <i>T. harzianum</i> a través de regiones conservadas.....	86
2.4 Secuenciación de ADN de las cepas con mejor comportamiento y análisis de datos.....	87
2.5 La variabilidad genética de las cepas de <i>Trichoderma harzianum</i>	87
2.6 Análisis de los datos	88
2.6.1 Análisis de datos genéticos.....	88
2.6.2 Generación de la matriz básica de datos.....	88

2.6.3 Relación genética entre las los aislamientos: Obtención de la matriz de similitud y generación del dendrograma.....	89
2.6.4 Generación de la matriz cofenética	89
2.6.5 Medida de confianza por re-muestreo o Bootstrapping	90
2.6.6 Análisis de la variabilidad genética.....	90
3 Resultados.....	91
3.1 Amplificación por PCR para la identificación específica de <i>T. harzianum</i> a través de regiones conservadas.....	91
3.2 Análisis de la variabilidad genética de las cepas de <i>Trichoderma</i>	92
4. Discusión	96

CAPÍTULO III CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS DE *T. harzianum*

1 Introducción	99
1.2 Objetivo.....	102
2. Materiales y métodos.....	103
2.1 Acondicionamiento de las cepas.....	103
2.2 Estudios morfológicos de <i>Trichoderma harzianum</i>	103
2.2.1 Radio de la colonia.....	103
2.2.2 Tamaño de conidio.....	104
2.2.3 Presencia y ubicación de las clamidospora	104
3 Resultados.....	104
3.1 Radio de la colonia	104
3.2 Tamaño de conidio	105
3.3 Presencia y Ubicación de las clamidospora	106
4. Discusión	107

**CAPÍTULO IV CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS
SELECCIONADOS DE *T. harzianum***

1. Introducción	109
1.1 Fisiología y relación con las condiciones ambientales.....	109
1.2 Mecanismos de <i>Trichoderma</i> implicados en el biocontrol de fitopatógenos: sistemas enzimático.....	112
1.2.1 Quitinasas.....	113
1.2.2 Glucanasas.....	114
1.2.3 Proteasas.....	114
1.3 Objetivos.....	115
2. Materiales y Métodos.....	115
2.1 Caracterización fisiológica.....	115
2.1.1 Crecimiento en diferentes temperaturas.....	115
2.1.2 Resistencia térmica.....	116
2.1.3 Crecimiento a diferente valores de pH	116
2.1.4 Asimilación de fuentes de carbono.....	116
2.1.5 Asimilación de fuentes nitrogenadas	117
2.2 Enzimas.....	117
2.2.1 Acondicionamiento de los aislamientos.....	117
2.2.2 Actividad β -1, 3 glucanasa	117
2.2.3 Actividad endoquitinasa	118
2.2.4 Actividad de la proteasa.....	118
3 Resultados.....	118
3.1 Caracterización fisiológica.....	118
3.1.1 Crecimiento en diferentes temperaturas.....	118
3.1.2 Resistencia térmica.....	119
3.1.3 Crecimiento a diferente valores de pH	120

3.1.4 Asimilación de fuentes de carbono.....	120
3.1.5 Asimilación de fuentes nitrogenadas.....	121
3.2 Actividad enzimática.....	122
3.2.1 Actividad β -1, 3 glucanasa.....	122
3.2.2 Actividad endoquitinasa.....	123
3.2.3 Actividad de la proteasa.....	124
4. Discusión.....	125

CAPITULO V INTEGRACIÓN DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES

1. Introducción.....	129
2. Materiales y métodos.....	130
2.1 Análisis de datos.....	130
2.2 Generación de la matriz básica de datos.....	130
2.3 Relación entre las los aislamientos: Obtención de la matriz de disimilitud y la generación de los dendrogramas.....	130
2.4 Generación de la matriz cofenética.....	131
2.5 Medida de confianza por re-muestreo o Bootstrapping.....	132
3. Resultado.....	132
3.1 Integración de atributos morfológicos fisiológicos y bioquímicos.....	132
3.2 Integración de los atributos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares.....	134
4. Discusión integradora.....	137
5. Conclusiones.....	143
6. Futuras investigaciones.....	144
BIBLIOGRAFÍA.....	145

ABREVIATURAS

ABCDPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad
act: gen de la actina
APG: medio de cultivo Agar Papa Glucosado
ARN: Ácido ribonucleico
cal1: gen de la calmodulina
CCR: coeficiente de correlación cofenética
Chi18 - 5 = ech42: gen de la endoquitinasa
CIDEFI: Centro de Investigación de Fitopatología
CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
CMD: medio de cultivo de harina de maíz dextrosa agar
Cz: medio de cultivo Czapek's Agar
ETI: efector activado de la inmunidad,
ETS: efector activado de la susceptibilidad;
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura
HR: respuesta de hipersensibilidad
IGS: espaciador intergénico
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISSR: Inter simple sequence repeat
ITS: región espaciadora interna transcrita
LSU: subunidad ribosomal grande
MAMPs: patrones moleculares asociados a los microorganismos
MHT: Mancha de la hoja del trigo
MTI: inmunidad activado por MAMPs
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos
PCNB: Pentacloronitrobenceno
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PIC: contenido de información polimórfica
PR: proteínas relacionadas con la patogénesis
PRB1: proteasa alcalina
PTI: la inmunidad activado PAMPs
QTL: locus de un carácter cuantitativo
RISR: sistémica inducida por rizobacterias
rpb2: gen de la subunidad b de la ARN polimerasa II
RSI: Resistencia sistémica inducida
SAR: resistencia sistémica adquirida
SCAR: secuencia caracterizada de la región amplificada
SINAVIMO: Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas
SNA: medio de cultivo sintético bajo en nutrientes
SSU: subunidad ribosomal pequeña
Tef1: gen del factor de elongación de la traducción 1- α
TSM: medio de cultivo selectivo para *Trichoderma*

Resumen

Frente a las consecuencias indeseables del control químico, la demanda pública de alimentos más sanos y el cambio actual de los paradigmas productivos, la tendencia es sustituir total o parcialmente los fungicidas sintéticos por métodos alternativos no contaminantes, en el marco del Manejo Integrado. El trigo es el cereal de mayor distribución geográfica en el mundo y su demanda irá en aumento debido al incremento de la población mundial. La región triguera en la Argentina abarca una zona muy amplia con condiciones favorables para la aparición de diversas enfermedades. Una de ellas, de origen fúngico, es la Septoriosis ó Mancha de la hoja del trigo (*Septoria tritici* Roberge in Desmaz. anamorfo; *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schroeter, in Cohn teleomorfo). A nivel mundial, ocasiona daños que oscilan entre 31 y 54% de reducción en el rendimiento y en Argentina entre 17 y 50% dependiendo del estado fenológico en el que ocurre la infección. El método utilizado tradicionalmente para el control de la enfermedad es la aplicación de productos químicos sintéticos. El uso masivo de estos productos favoreció la aparición de patógenos resistentes además de las graves consecuencias la contaminación del ambiente. Utilizando microorganismos antagonista, el control biológico, ha tomado relevancia en estos últimos años. Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas, producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores. Estas especies basan sus propiedades antagónicas en la activación de mecanismos muy diversos. Uno de ellos es que pueden ejercer el biocontrol de hongos fitopatógenos indirectamente, compitiendo por el espacio y los nutrientes, modificando las condiciones ambientales, estimulando el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa. Otra medida, es mediante el micoparasitismo, por la penetración directa de las hifas al hospedador y/o por producción de enzimas extracelulares. El objetivo de este trabajo es presentar un estudio integrado, que combine propiedades: morfológicas, fisiológicas y moleculares de los aislamientos nativos de *T. harzianum*, para ser utilizarlos como eficientes agentes de control biológico. En este estudio se evaluaron 240 aislamientos de *Trichoderma* obtenidas de muestras de suelo de diferentes localidades de la región triguera argentina. La capacidad antagónica se ensayó en plántulas de trigo, en invernáculo. Para seleccionar las cepas de *Trichoderma harzianum* se tuvo en cuenta la capacidad de reducir en un 50 % tanto la superficie necrosada como la cobertura picnidial generada por *M. graminicola*. Se obtuvieron de esta manera 37 cepas del antagonista. Los

resultados presentados hasta el momento evidencian la importancia de resistencia sistémica inducida (RSI) actuando en la defensa de la planta contra *M.graminicola*. Para la identificación de los aislamientos de *Trichoderma* se utilizó la técnica de PCR con los cebadores forward THITS-F2 y reverse THITS-R3 los cuales permiten identificar específicamente a *T. harzianum*. Para la caracterización genética intraespecífica se utilizaron marcadores ISSR. Con los resultados obtenidos se agruparon las cepas, en tres grupos de similitud. Estos grupos no presentaron correspondencia con el origen geográfico, ni con el año de aislamiento y ni con los distintos niveles de antagonismos. Los resultados de la caracterización morfo-cultural, el crecimiento radial y el color de las colonias, la coloración del medio de cultivo y el tamaño y la forma de los conidios no presentaron diferencias con las descritas en la taxonomía clásica para la especie *T. harzianum*. La presencia de las clamidosporas y su ubicación en el micelio, fue la característica que demostró mayor variación en el presente estudio. El 27 % de las 37 cepas estudiadas no formaron clamidosporas durante el tiempo de duración del ensayo. De aquellas cepas que si las formaron, el 59% se ubicaron de manera intercalar y el 26 % tanto terminales como intercalares. Sólo el 15% de las cepas formaron clamidosporas terminales. Los aislamientos se caracterizaron fisiológicamente en base a los siguientes parámetros: crecimiento de las colonias en diferentes fuentes carbonadas y nitrogenadas, crecimiento de las mismas bajo condiciones extremas de temperatura y pH. Los resultados presentaron escasa variabilidad por sí solos y no generaron una discriminación entre las cepas. La caracterización de la actividad enzimática destacó a dos cepas (2 y 8) como capaces de producir altos niveles de β -1-3 glucanasa, quitinasa y proteasa. Es importante resaltar en este estudio la relación encontrada entre las cepas cuando se integraron los atributos morfológicos, fisiológicos y moleculares. Con esta combinación se pudo observar una clara correspondencia entre ellas y su origen geográfico. Como ejemplo de ello, las cepas que integran el grupo I se encuentran divididas en dos ramas bien diferenciadas. Así las cepas 1, 5, 8 y 12 pertenecen a la localidad de Los Hornos y las cepas 160, 162, 165, 170 y 177 a la de Lobería. Con los resultados obtenidos en este trabajo se reconocieron una serie de propiedades (morfológicas, fisiológicas y moleculares) que sumadas a la identificación tradicional de *T. harzianum*, servirán para ampliar la caracterización de las cepas de esta especie como agentes de biocontrol y seguir su evolución en el tiempo y en medio ambiente cuando éstas se apliquen con fines biotecnológicos.

ABSTRACT

Facing the undesirable consequences of chemical control, the public demand of the healthiest foodstuff and the current change of the productive paradigms, the tendency is to replace totally or partially the synthetic fungicides with alternative non-contaminating methods, in the framework of Integrated Management. Wheat is the largest geographical distribution cereal in the world and its demand shall rise due to the increase in the global population. The wheat-growing region in Argentina covers a very large zone with favourable conditions for the appearance of diverse diseases. One of them, of fungal origin, is the *Septoria tritici* Blotch (Anamorph *Septoria tritici* Roberge in Desmaz. Teleomorph *Mycosphaerella graminicola* [Fuckel] J. Schroeter in Cohn). It causes damages that oscillate between 31 and 54% of reduction in the performance at worldwide level and in Argentina between 17 and 50% depending on the phenological stage in which the infection occurs. The method traditionally used for the control of the disease is the application of chemical synthetic products. The massive use of these products favoured the emergence of resistant pathogens, besides the serious consequences of the environment pollution. The biological control, using antagonistic microorganisms, has gained relevance in the last years. *Trichoderma* species are the most used antagonist for the disease control of plants, produced by fungus, due to their ubiquity, ease to be isolated and cultured, their fast growth in a large number of substrates and that they do not attack higher plants. These species found their antagonistic characteristics in the activation of various mechanisms. One of them is that they are able to apply the biocontrol of plant pathogenic fungus indirectly, competing for the space and the nutrients, modifying the environmental conditions, stimulating the plants growth and their defence mechanisms. Another measure is through mycoparasitism, for the direct penetration from the hyphae to the host and/or for the production of extracellular enzymes. The **objective of this work is** to introduce an integrated study, which combines morphological, physiological and molecular characteristics of the native isolations of *T. harzianum*, to be used as efficient agents of biological control. In this study, 240 isolations of *Trichoderma* were tested, obtained from soil samples of different localities of the Argentinian wheat-growing region. The antagonistic capacity was tested in wheat seedlings, in a greenhouse. To select the strains of *Trichoderma harzianum*, the capacity to reduce a 50% of the severity (necrotic and pycnidial coverage percentages) generated by *M. graminicola*, was taken into account Thirty seven strains of the antagonists were obtained in this way. The results presented so far, make clear the importance of the ISR (Induce Systemic

Resistance) acting in defence of the plant against *M. graminicola*. For the identification of the *Trichoderma*, isolations PCR technique was used with forward primers THITS-F2 and reverse THITS-R3 which allow the specific identification of *T. harzianum*. For the intraspecific genetic characterization ISSR markers were used. With the results achieved, the strains were pooled in three groups of similarity. These groups did not present any correspondence with the geographical origin, neither with the isolation year, nor the different levels of antagonism. The results of the morpho-cultural characterization, radial growth and the colonies colour, the colouration of the medium of culture and the conidia size and shape did not present any differences with the ones described in the classic taxonomy for the *T. harzianum* specie. The presence of chlamydospores and their location in the mycelium was the characteristic that showed a greater variation in this study. Twenty seven percent of the 37 strains that were studied did not form chlamydospores during the testing time. From those strains that produced chlamydospores, 59% of them were intercalated and 26% were both terminal and intercalated. Only 15% of the strains formed terminal chlamydospores. Isolations were physiologically characterized based on the following parameters: colonies growth in different carbonated and nitrogenous sources under extreme temperature and pH conditions. The results showed low variability by themselves and did not generate discrimination between the strains. Throughout the characterization of the enzyme activity two strains (2 and 8) were selected to produce high levels β -1-3 glucanase, chitinase and protease. It is important to emphasise in this study, the relationship found between the strains, when the morphological, physiological and molecular attributes were integrated. With this combination, a clear correspondence between themselves and their geographical origin could be observed. As an example, the strains of group I are divided in two clear different branches. In such a way, strains 1, 5, 8 and 12 belong to Los Hornos locality and strains 160, 162, 165 and 177 to Lobería. As regards the results obtained in this work, a series of properties (morphological, physiological and molecular) were recognised that, together with the conventional identification of *T. harzianum*, shall serve to broaden the characterization of this specie strains as biocontrol agents and continue their evolution in time and environment when they are applied with biotechnological purposes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El cultivo de trigo

1.1 Origen del trigo

1.1.1 Geográfico

Al trigo (*Triticum aestivum* L.) se le atribuye un rol importante en la alimentación humana, considerándolo como el mejor de los alimentos de cereales. Pertenece al género *Triticum*, (tribu *Triticeae*, familia de las *Poaceae*). Este cereal es el de mayor distribución geográfica en el mundo y su demanda irá en aumento debido al incremento de la población. Constituye la principal fuente de hidrato de carbono del mundo occidental

Existe divergencia sobre el origen geográfico del cultivo de trigo, aunque se menciona la región mediterránea como el lugar desde donde se dispersó. Los ancestros de los trigos actuales podrían haber tenido su origen tanto en la Mesopotamia, como en las tierras de Etiopía, según los datos históricos disponibles. Las primeras plantas fueron encontradas en lo que son hoy los lagos de Suiza en las ruinas de los pobladores de la edad de piedra quienes vivieron allí posiblemente, hace 10.000 a 15.000 años. Otras opiniones atestiguan que fue originario de Asia Menor y se expandió después a los países de la cuenca del Mediterráneo y a algunos países asiáticos. Más tardes alcanzó al resto de Europa y posteriormente, luego de su descubrimiento y colonización, a América y Oceanía (Tombetta & Nissi, 1998).

En nuestro país el trigo fue introducido por Sebastián Gaboto en el año 1527. La primera siembra se realizó en el fuerte de Sancti Spiritu, que se encontraba en la desembocadura de Río Carcarañá, en la provincia de Santa Fe. Por más de tres siglos se lo continuó cultivando en forma muy precaria, alrededor de las aldeas, no alcanzando a cubrir el consumo de la población, por lo que se debía importar harina. El trigo, fue por lo tanto el cultivo pionero o fundador de la colonización agrícola de la región pampeana (Miralles & González, 2009).

1.1.2 Genético

Los Trigos, desde el punto de vista botánico, tienen una historia evolutiva compleja, formando una serie de poliploides estrechamente relacionados entre sí, que pueden combinarse en la naturaleza. Las especies pueden ser divididas en grupos de

diploides ($2n = 14$), tetraploides ($2n = 28$) y hexaploides ($2n = 42$). Dos especies de trigo diploide y dos especies de *Aegilops* están involucradas como ancestros de todos los trigos cultivados. Las especies silvestres diploides y tetraploides se desgranar a la madurez. El primer paso en la domesticación del trigo fue la selección de especies que no se desgranaran a la madurez. Todos los trigos silvestres son invernales, con semillas pequeñas, rojas y blandas que poseen una extensa dormancia. La selección de trigos de hábitos primaverales y blancos, blandos y sin dormancia ocurrió por el cultivo del mismo. Actualmente, los trigos diploides son raramente cultivados. El 90-95 % de los cultivos cosechados son hexaploides de trigo pan y el resto son tetraploides tipo duro.

La base genética de los trigos cultivados es muy estrecha, debido al origen y su forma de domesticación. El conocimiento de sus relaciones filogenéticas es cada vez más usada para enriquecer el pool de genes de los trigos cultivados, dando resistencia a enfermedades y ciclos más cortos con altos rendimientos. Además, el conocimiento de la secuenciación del genoma del trigo pan, es otra de las importantes tecnologías para lograr el mejoramiento de este cultivo (Gill, 2010).

La amplia gama de productos elaborados con trigo lleva a definir varias clases del mismo. El trigo duro o también denominado "Durum" es usado principalmente en pastas y en pan realizado sin levaduras. El trigo "Pan" puede ser de hábitos invernales o primaverales, de semillas rojas o blancas y pueden ser blandos o duros. Los trigos duros contienen alto contenido de proteína (alrededor de 12%) y son usados para pan y fideos. Mientras que los trigos blandos tiene bajo contenido de proteína y son usados en productos como pasteles, galletitas y harina para todo uso (Gill, 2010).

1.2 Evolución de los rendimientos y de la superficie sembrada en Argentina

A partir de 1870 la expansión del cultivo de trigo se intensificó, favorecida por las corrientes migratorias, la colonización, el desarrollo del transporte terrestre y marítimo y el aumento de la demanda de alimentos por los países de Europa, entre otras series de factores. Desde los comienzos de siglo XX hasta la actualidad, los avances en el rendimiento y en la producción fueron graduales pero sostenidos.

En la primera década de "1900" la Argentina ocupó el primer lugar como exportador, con un 23% de la producción mundial. Con el auge de la tractorización y el manejo a granel, en la década del 50 y el 60 se vieron incrementados los rendimientos por hectárea y la producción. Cabe destacar, que a comienzo de la década del 60 se

iniciaron las investigaciones en conjunto con el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo), mediante un programa interdisciplinario de investigación en el mejoramiento varietal, sanidad y mantenimiento de la calidad del trigo. Para ampliar la base genética del trigo se realizaron cruces con materiales genéticamente divergentes, introduciendo germoplasma mejicano a trigos argentinos. De esta manera se incorporaron genes de enanismo, de resistencia a enfermedades como la “Roya del tallo” causada por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* y se mejoraron los componentes del rendimiento.

En la década del 70 bajo la influencia de la filosofía de lo que se denominó “revolución verde”, los sistemas de producción de alimentos se orientaron a la búsqueda de paquetes de tecnologías generales y universales destinados a maximizar el rendimiento. La capacidad potencial de los cultivos se debía lograr proporcionándole las condiciones ecológicas ideales. La idea era modificar el ambiente (insumos mediante) adecuándolo al genotipo para que se pueda expresar todo su potencial de rendimiento (Sarandón, 2002). Esto llevó, a que con la aceptación del germoplasma mejicano y el uso de agroquímicos (herbicidas, insecticidas y fertilizantes) se registrara un importante aumento en la producción de trigo y en sus rendimientos por hectáreas.

En la década del 80, el CIMMYT se encargó de incorporar germoplasma ruso invernol proveniente de cultivares invernales o primaverales (trigo ruso invernol Aurora, Bezostaya1, Kavkaz). Con el cruzamiento de cultivares invernales x primaverales se obtuvieron en el país algunas variedades comerciales como: Don Ernesto INTA, ProINTA Oasis, ProINTA Federal Buck Bagual, ProINTA Pigue, Cooperación Calquín. Este tipo de cruzamientos contribuyó a mejorar la resistencia a “mancha de la hoja del trigo”, destacándose aquellas líneas que poseían la translocación trigo-centeno 1B/1R (derivada de los trigos ruso-invernol Aurora y Kavkaz) (Cordo *et al.*, 1994). A comienzos del año 2.000 se demostró, con inoculaciones artificiales a campo, la variación de la resistencia de 50 cultivares nacionales. En general se observó que un medio ambiente con mayor precipitación resultó más favorable para la ocurrencia de la enfermedad. Los cultivares Klein Estrella y Klein Volcán mostraron alto nivel de resistencia en todos los experimentos en plántula y adulto. Klein Dragón, Buck Chambergó, ProINTA Punta, Klein Don Enrique, Buck Fogón y Buck Panadero, fueron moderadamente resistentes. Otros cultivares como Buck Chambergó, con moderado nivel de resistencia en plántula, fue más susceptible en estado adulto. Además se determinó que la resistencia de la Mancha de la hoja de trigo (MHT), no está asociada con la fecha de espigazón o con

la altura de planta. También se determinó que las condiciones ambientales predisponentes fueron más favorables para la expresión de la enfermedad en los cultivares tempranos que los tardíos. Dado que en general, la alta humedad y precipitaciones, acompañada de la baja radiación en el momento de la infección han sido indicadas como condiciones conductivas para el desarrollo de la enfermedad.

En la campaña triguera 2010/2011 la producción fue de 15,88 millones de toneladas, con una tendencia al incremento de la superficie sembrada y en la producción de trigo significando un aumento del 27% frente a la campaña anterior. Esta tendencia no pudo ser sostenida en las campañas posteriores debido a la falta de financiamiento y a las condiciones ambientales desfavorables durante la siembra y la cosecha. En el informe semanal de la Bolsa de Cereales de Rosario (Estimaciones Agrícolas RELEVAMIENTO AL 17 de enero de 2013) estimó que para la campaña triguera, 2012/2013, la producción fue de 9.800.000 toneladas, equivalente a un 30% menos de la lograda en ciclo previo. Para la campaña en curso, 2013/2014, la Bolsa de Cereales de Rosario estima que el área sembrada, hasta el mes de agosto, es de 3.900.000 hectáreas (Panorama Agrícola Semanal de BOLSA DE CEREALES Estimaciones Agrícolas RELEVAMIENTO AL 8 de agosto de 2013).

1.3 Usos del trigo en Argentina

Los trigos de mayor difusión mundial son los trigos “blandos”, cuya harina se utiliza para la elaboración de galletitas; el trigo pan que es utilizado principalmente para distintos tipos y formas de panificados y el trigo fideo que se utiliza para la elaboración de pastas.

En las últimas décadas, en el país prácticamente se cultiva un solo tipo comercial, tipo duro de panificación directa y una mínima parte de trigo candeal. La producción de un solo tipo de trigo se agrava, además, por la falta de una clasificación del grano, debido a la aplicación de un sistema demasiado simple y directo de almacenaje. Durante la cosecha, los granos provenientes de distintos lotes, con calidades diferentes, se almacenan en el mismo silo. De esta manera, hasta el momento, un único tipo de trigo es utilizado para la industrialización de diversos productos: pan, galletitas, fideos y repostería, siendo que existen en el mercado internacional, clases para cada propósito. Los países exportadores como Canadá, EE.UU., Australia y Francia, con los que se compite, además de producir diferentes clases de trigos, clasifican su producción en distintos grados y tipos comerciales, teniendo en cuenta su contenido proteico, calidad industrial y usos, entre otras

características, lo cual les permite satisfacer todo tipo de demanda, tanto interna como externa (Tombetta & Nisi, 1998).

1.4 Subregiones ecológicas de la región triguera argentina

La región triguera argentina se extiende desde los 25° de latitud sur, incluyendo la zona de Chaco y Formosa, hasta los 40° LS, con los departamentos de Patagones y Villarino. De este a oeste abarca desde los 58° a los 66° de longitud oeste. La zona Triguera tradicional está limitada al norte por la isoterma de 13° C de julio, mientras que en el sur lo es por la de 7°C, valor acorde a los requerimientos invernales de este cultivo. Es una dilatada llanura casi plana o ligeramente ondulada, solamente quebrada por las serranías del sur de la provincia de Buenos Aires, con altura máxima cercana a los 1200 mts. La región tradicional abarca las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, La Pampa y Entre Ríos, con una extensión de 1000 km en sentido Sur-Norte y de 600 km de Este a Oeste. En los últimos años la región triguera se ha extendido a áreas no tradicionales como son las provincias que integran el NOA y el NEA.

El cultivo de trigo en la Argentina se realiza bajo condiciones de secano. En consecuencia el resultado de las cosechas está fundamentado en la distribución de las lluvias en el año y la economía del agua en el suelo, más que de la precipitación total. En esta amplia región, el trigo se siembra desde principios de otoño hasta fines de invierno y se cosecha entre noviembre y enero según la latitud.

Como resultado de esta amplitud y la diversidad de ambientes, el Ministerio de Agricultura en la década del 30, estableció seis Regiones Trigueras que luego fueron modificadas a cinco en 1952 (Tombetta & Nisi, 1998). Las subregiones trigueras fueron nombradas de la siguiente manera: I, II Norte, II Sur, III, IV, V Norte y V Sur (figura 1). Estas subregiones se establecieron con el propósito de aconsejar a los productores, las variedades de mejor comportamiento para cada región, a través de una red de ensayos territoriales ubicados en diferentes localidades de la región triguera.

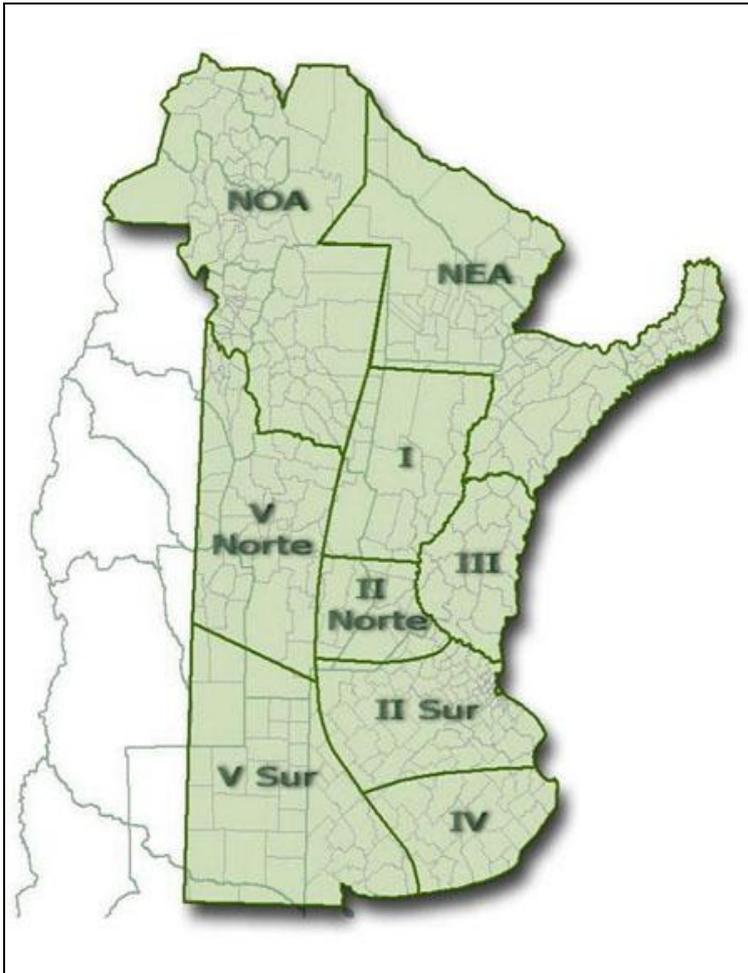


Fig. 1. Subregiones trigueras de la Argentina (Fuente SINAVIMO)

Subregión I:

Comprende el centro norte de Santa Fe y el departamento cordobés de San Justo. El clima es considerado húmedo-subhúmedo, con un promedio anual de precipitaciones que varía de 860 mm en el noroeste a 1000 mm en el sudeste. La distribución de las lluvias es marcadamente estacional, concentrándose en primavera-verano el 70%. Los inviernos son cortos y suaves, con temperaturas promedio de 13 - 14° C. Estas temperaturas acortan el período de macollaje y aceleran el crecimiento y desarrollo. La fecha media de última helada es de alrededor del 10 de octubre \pm 20 días.

Subregión II Norte

Comprende un pequeño sector del noreste de la provincia de Buenos Aires, el sur de Santa Fe y los departamentos de Unión y Marcos Juárez de Córdoba. El clima

es templado subhúmedo, con temperaturas y humedad en el sector este, adecuadas para el cultivo. Resultan más favorables que las condiciones descritas para la anterior subregión, con temperaturas menores en julio y agosto y más disponibilidad de precipitaciones en septiembre. Este mismo sector resulta coincidente con un clima más continental, con otoños, inviernos y primaveras más secas y frías y con mayores riesgos de heladas tardías.

Subregión II Sur

Es una región netamente bonaerense que se puede considerar como intermedia, en relación al manejo y a la utilización de cultivares, entre el norte y el sur. Se caracteriza por tener temperaturas cercanas al óptimo requerido para el macollaje en los meses de junio, julio y agosto. En relación a las precipitaciones anuales, son del orden de los 1000 mm aunque disminuyen hasta 800 mm hacia el oeste y sudoeste. La distribución de las mismas, resulta bastante adecuada para el cultivo de trigo. La distribución es la ya conocida para todo el clima continental. Las lluvias más abundantes se producen en la primavera y el verano y en invierno son moderadas. Hacia el oeste se manifiestan fuertes períodos de sequía durante la época de siembra y principios de desarrollo del cultivo, mientras que al este se disponen por lo general de exceso de lluvias que dificulta el cultivo de este cereal.

Subregión III:

Comprende la provincia de Entre Ríos. El clima de esta región puede definirse como templado-cálido, con una temperatura media anual de 18-20°C. Las lluvias (800-1000 mm anuales) aumentan de sur a norte y de oeste a este concentrándose en el otoño. Los meses de más baja precipitación son julio y agosto y las primaveras son lluviosas (altamente predisponentes al desarrollo de enfermedades).

Subregión IV:

Esta subregión es la de mayor productividad del país con una tendencia firme al crecimiento en todos los indicadores. Se ubica en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, integrada por los partidos costeros que van desde General Pueyrredón hasta Tres Arroyos e incluyendo algunos del centro provincial, con una alta concentración de siembra de trigo. El clima resulta casi el óptimo para los requerimientos del cultivo, que cumplen muy bien en sus diferentes estados de desarrollo desde la siembra a la cosecha. Es un clima templado frío, con inviernos

largos y primaveras frescas. Hay riesgos de heladas tardías, con una fecha media de última helada entre el 15 y el 20 de octubre. En relación a las precipitaciones, tienen una adecuada distribución y son regulares en su ocurrencia.

Subregión V Norte

Comprende la casi totalidad de la provincia de Córdoba, con excepción de los departamentos de General Roca (V sur), Marcos Juárez y Unión (II norte) y San Justo (I). Incluye también el norte de San Luis y el sur de Santiago del Estero. La subregión está situada entre las isohietas de 600 y 800 mm anuales. Presenta situaciones de déficit de agua por elevada evapotranspiración, con una sequía invernal bien definida. Casi el 85% de las precipitaciones son primavero-estival.

Subregión V Sur

Es la más extensa de las subregiones. Ocupa 16 departamentos de La Pampa, uno de Córdoba y 15 del oeste y sur bonaerense. Se caracteriza por un clima continental, de marcada amplitud estacional y aún diaria. Tiene escasez de lluvias, de distribución estacional e irregular. Los inviernos son largos y rigurosos y pueden ocurrir heladas de hasta -12°C , que afectan el cultivo en estado vegetativo. Las siembras son también en la primera quincena de junio. La fecha media de última helada está entre el 15 y 20 de octubre, aunque las más frecuentes ocurren en los primeros días de noviembre afectando significativamente al cultivo.

2. Interacción Patógeno–Hospedante

2.1 Enfermedades foliares del trigo en la Argentina

Siendo tan amplia la región triguera en la Argentina, se dan condiciones favorables para la aparición de diversas enfermedades. Entre ellas se destacan las enfermedades que producen síntomas en el follaje o canopeo del trigo, como las manchas foliares, los tizones, el oídio, las royas y los mosaicos generados por virus. Estas afectan el metabolismo normal del proceso de fotosíntesis por inducir alteraciones fisiológicas y por reducir el área de tejido verde fotosintéticamente activo.

Considerando la magnitud de las pérdidas de rinde que ocasionan, las principales enfermedades foliares que afectan al cultivo de trigo en la región pampeana argentina son: roya de la hoja (*Puccinia triticina*), mancha amarilla de la

hoja [*Pyrenophora tritici-repentis* (anamorfo: *Drechslera tritici-repentis*)], y septoriosis de la hoja [*Mycosphaerella graminicola* (anamorfo: *Septoria tritici*)] (Carretero, 2010).

El impacto de una enfermedad sobre el rinde de un cultivo dependerá, además del nivel de enfermedad, del momento en que alcanza tal nivel en el ciclo del cultivo, de la posición vertical del canopeo en que aparezca la enfermedad, del estado y cobertura foliar del cultivo, del potencial de rinde del mismo y del comportamiento sanitario de la variedad sembrada. La toma de la decisión del control dependerá de posibilidad de predecir la evolución de la enfermedad en el tiempo.

2.2 La mancha de la hoja de trigo

2.2.1 Importancia económica

Actualmente, la “septoriosis del trigo” está presente en las principales zonas de cultivo del mundo. Esta enfermedad es constantemente clasificada entre las enfermedades del trigo más dañinas en Australia, Europa, América del Norte y del Sur. Más del 70% de todos los fungicidas se aplican al trigo para controlar la “septoriosis” (Eyal *et al.*, 1987).

La “septoriosis” del trigo es una enfermedad endémica en nuestro país. En el sudeste de la región triguera es la enfermedad más importante. En el resto del área húmeda-subhúmeda, ubicada al norte de la anterior, tiene similar nivel de importancia al de las royas negra y anaranjada y a la fusariosis de la espiga. La incorporación al cultivo de variedades de alto potencial de rendimiento en los años 70, trajo aparejado un aumento en la intensidad de los ataques de “septoriosis” de la hoja, en concordancia con la mayor susceptibilidad que mostraron, comparadas con los trigos tradicionales cultivados hasta entonces (Kraan & Nisi, 1993).

2.2.2 El agente causal

La “Mancha de la Hoja” (MHT) o “Septoriosis” es producida por *Septoria tritici* (Roberge in Desmaz), estado anamorfo o asexual del hongo. El estado sexual o teleomorfo es *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt. Dentro de la clasificación taxonómica, este hongo pertenece al Reino Fungi (Hongos verdaderos), Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina; Clase Dothideomycetes (antes Ascoloculomycetes; Orden Dothideales y Familia Dothideaceae. Caracterizados por tener ascos bitúnicados y pseudotecio periteciode.

La conexión de *S. tritici* con *M. graminicola* fue sospechada por muchos años y confirmada por los experimentos realizados por Sanderson (1976). Previamente, Sanderson (1972) en sus trabajos sobre la taxonomía de *S. tritici* descubrió sobre rastrojo de trigo en Nueva Zelanda, especies de *Mycosphaerella*. A partir del cultivo de las ascosporas de esta especie se formaron colonias típicas de *S. tritici* que se usaron para preparar suspensiones de conidios para la inoculación de hojas de trigo. El hongo imperfecto derivado de *Mycosphaerella* se confirmó como *S. tritici* y el estado perfecto identificado como *M. graminicola* (Fuckel) Sanderson. *Mycosphaerella graminicola* puede ser confundido con *Didymella exitialis*, que a menudo se encuentran en las hojas de trigo. Este forma ascosporas sin color y bicelulares como *Mycosphaerella*, pero éstas son elipsoidales mientras que las ascosporas de *Mycosphaerella* son alargadas (Müller, 1989).

La fase sexual de *S. tritici* se ha encontrado en rastrojo de trigo en Australia (Brown *et al.*, 1978), en Chile (Madariaga, 1986), en el centro del Reino Unido (Scott *et al.*, 1988), en Brasil (Metha, 1989), en California (Madariaga *et al.*, 1989), los Países Bajos (Shaw & Royle, 1989) y Oregón (Ahmed *et al.*, 1995).

El estado sexual en Argentina fue determinado por Cordo *et al.* (1990). Estos autores sugirieron que el teleomorfo es importante en el inicio de una nueva infección en el próximo periodo del cultivo trigo (Cordo *et al.*, 1999). Hunter *et al.* (1999) y Cordo *et al.* (2005) demostraron que las ascosporas tienen tendencia a ser liberadas durante todo el año. Chen & Mc Donald (1996) sugirieron que las ascosporas constituyen la fuente primaria de inóculo más importante para generar la enfermedad.

Desde el punto de vista de su nutrición, este hongo, es considerado hemibiótrofo (Kema & van Silfhout, 1996), ya que inmediatamente después de la penetración, las hifas colonizan los espacios intercelulares sin causar la muerte de las células por un período de 3 a 5 semanas antes de que ocurra la necrosis y la esporulación. Además, se caracteriza por ser casi enteramente dependiente del rastrojo y por lo tanto se ha visto beneficiado en los últimos años por la siembra directa. Al no presentar estructuras de resistencia en el suelo, su supervivencia está casi condicionada a la colonización de los tejidos durante el ciclo del cultivo, antes de que haya terminado el proceso de senescencia o muerte natural de la planta (Stewart *et al.*, 2002).

El desarrollo y ciclo de la enfermedad están altamente influenciados por las condiciones ambientales (lluvias frecuentes y temperaturas moderadas). *S. tritici* produce picnidios con picnidiosporas unicelulares, septadas o no. Las septadas pueden presentar de 3 a 4 septos según Sprague (1950) o también de 2 a 7 septos según Metha, en Brasil (1989) para cada picnidiospora. La forma sexual produce pseudotecios con ascosporas bicelulares en su interior (Eyal *et al.*, 1987).

2.2.3 Especialización fisiológica del patógeno

La variación genética en *M. graminicola* es muy grande. McDonald & Martínez (1990) identificaron 22 haplotipos diferentes entre los 93 aislamientos realizados a partir de un solo campo de trigo. Boerger *et al.* (1993) identificaron diferentes genotipos que provenían de una única lesión, mientras que el análisis de diferentes conidios provenientes del mismo picnidio presentó genotipos idénticos.

Kema *et al.* (1996a) describió que la variación genética para la virulencia entre los 80 aislamientos analizados, proporcionó pruebas de especificidad para las especies patógena y cultivares hospedantes. El alto grado de variación genética entre *M. graminicola* destaca el papel de gran importancia que poseen las ascosporas en la epidemiología de MHT (Shaw & Royle, 1993).

Existen estudios contradictorios en cuanto a la especialización fisiológica de *S. tritici*. Los cultivos de *S. tritici* aislados en Israel se han comportado como razas, en la connotación convencional, tanto en *Triticum aestivum* como en *T. durum* (Eyal *et al.*, 1973, Yehilevich-Auste *et al.*, 1983). Su carácter parasitario ha permanecido estable a pesar de trasposos sucesivos de un hospedante a otro y a las transferencias repetidas en medios de cultivo. Los aislamientos obtenidos a partir de *T. aestivum* no fueron por lo general virulentos en *T. durum*, con algunas excepciones (Eyal *et al.*, 1973). En Túnez, al parecer la mayoría de los trigos duros carecían de resistencia, en tanto que varios trigos harineros fueron muy resistentes a la población local de *S. tritici* (Djerbi *et al.*, 1976).

Los aislamientos y las variedades pueden diferir considerablemente en cuanto al periodo de incubación, el porcentaje de superficie foliar infectada y el número de picnidios que producen (Diaz, 1983). La interacción entre variedades y aislamientos también puede influir en los parámetros antes mencionados, circunstancia que sugiere la existencia de razas (Eyal *et al.*, 1987). Se han encontrado evidencias de interacciones diferenciales con distintas variedades de trigo en países como, Israel,

Australia, Uruguay, Marruecos y los Estados Unidos, lo que sugiere la especialización fisiológica con *S. tritici* (Eyal *et al.*, 1973; King *et al.*, 1983; Ballantyne, 1985; Saadaoui, 1987).

Shipton *et al.* (1971), evidenciaron la existencia de formas especializadas en *S. tritici*, sin embargo no se han podido distinguir razas fisiológicas dentro de estas formas especiales, aunque los aislamientos difirieron en el grado de virulencia (King *et al.*, 1983). En Argentina, Cordo & Arriaga (1990) determinaron diferentes niveles de patogenicidad en cuatro cultivares de trigo con nueve aislamientos *S. tritici*. Cada aislamiento produjo una reacción diferente en cada cultivar y ninguna de las reacciones fue igual, que la producida por los otros aislamientos. A pesar de la alta variabilidad de la interacción hospedante-patógeno, no se observó ninguna diferencia apreciable en la respuesta del cultivar. Debido a esto, los aislamientos no se clasificaron en razas fisiológicas.

Eyal *et al.* (1985) evaluaron la virulencia de 97 aislamientos de *S. tritici* por su capacidad para generar la enfermedad en plántulas obtenidas de 35 cultivares de trigo y triticale. Se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos y las interacciones con el cultivar, lo cual sugiere la existencia de genes específicos de virulencia. Además, existen antecedentes en los cambios de virulencia de los aislamientos de *M. graminicola* cuando se pasan a un nuevo hospedante (Cordo *et al.*, 1998). Por otra parte se ha mencionado un incremento en la virulencia al pasar sucesivas veces un aislamiento por el huésped del que se obtuvo (Cordo *et al.*, 1998).

Los últimos hallazgos sobre las interacciones de *S. tritici* y los diferentes germoplasma de trigo fueron realizados por Castillo (2010). Se identificó la resistencia parcial y específica de un set de cultivares argentinos con buenos niveles de resistencia, inoculándolos con los aislamientos de las subregiones IV y II Sur, caracterizados por su diversidad genética. La resistencia aislamiento específica fue detectada en algunos materiales. En el estado adulto, Oasis, TE 9111, IAS 20, Klein Volcán y Buck 75 Aniversario presentaron resistencia parcial. El cultivar Oasis presentó resistencia específica frente a algunos aislamientos. Simón *et al.*, (2012) demostraron que los cultivares argentinos, "Klein Dragón", "Buck 75 Aniversario" y "Klein Volcán" presentaban resistencia parcial o resistencia moderada frente a los aislamientos de *S. tritici* con distinta variabilidad genética. Esto indicó la presencia de resistencia parcial en las plantas de semillero.

Los estudios de interacción diferencial resultan muy beneficiosos para los productores, fitogenetistas y patólogos si se comprueba que los resultados son estables en una extensión de tiempo.

2.2.4 Adaptación del patógeno a las gramíneas hospedantes

Los géneros *Septoria* y *Stagonospora* poseen más de 2.000 formas-especiales de hongos, la mayoría de ellos parásitos de las plantas. Los dos más importantes *M. graminicola* y *Phaeosphaeria* atacan al trigo causando grandes pérdidas en el hemisferio Norte (Scharen, 1999).

En el pasado, todos los patógenos del género *Septoria* y *Stagonospora* estaban ubicados dentro del género *Septoria*, pero en el último tiempo por diferencias morfológicas, varias de esas especies pasaron a formar parte del género *Stagonospora*. Una diferencia morfológica básica entre los dos géneros es la forma de producir macroconidios filamentosos. Los de *Septoria* son significativamente más delgados que los macroconidios de *Stagonospora* (Sprague, 1950). Además, los teleomorfos proveen una justificación adicional del cambio en su taxonomía (Cunfer, 2000), *Septoria* spp. tiene como teleomorfo a un Ascomycota del género *Mycosphaerella*, cuando se encuentra presente. Por otra parte los teleomorfos de *Stagonosporas* spp. sobre cereales, pertenecen actualmente al género *Phaeosphaeria* (Khashnobish & Shearer, 1996; Cunfer, 2000).

Weber (1923) observó que las especies de *S. tritici* no infectaban plantas de cebada, por lo tanto las cepas encontradas por Johnson (1916) pertenecían a *Septoria passerinii*. Los análisis moleculares de la región conservada ribosomal del ITS, para ampliar la base genética del trigo determinaron que ambas especies (*S. tritici* y *S. passerinii*) están muy relacionadas entre sí (Goodwin & Zismann, 1999). Por otro lado, *S. passerinii* posee un rango amplio de hospedantes que incluyen varias especies del género *Hordeum* como por ejemplo a *Hordeum vulgare* (Cunfer, 2000).

Sprague (1950) consideró 3 formas-especiales del hongo *S. tritici* basadas primariamente sobre el rango de hospedantes y la morfología de sus conidios. Estos son *S. tritici* f. *avenae* encontrada sobre plantas de avena, *S. tritici* f. *holci* hallada sobre plantas de *Holcus* spp. y *S. tritici* var. *lolicola* localizadas sobre plantas de *Lolium* spp. (Cunfer, 1994).

Entre los hospedantes que infecta *S. tritici* (Roberge in Desmaz.) f. *avenae* se encuentran *Avena byzantina* (Koch), *Avena fatua* L. y ocasionalmente ataca cultivos de avena (*Avena sativa*) (Sprague, 1950). Madariaga & Scharen (1985) comprobaron en Chile que el patógeno aislados en *A. fatua*, era *S. tritici* pero no se infectaron las plantas de trigo. Tampoco infectó plantas de *Bromus tectorum* en inoculaciones artificiales en invernáculos (Sprague, 1934). Por lo contrario, *S. tritici* aisladas de plantas de trigo no infectó plantas de avena (Weber, 1922).

2.2.5. Actualización filogenética del género *Septoria*

Durante muchos años el género *Mycosphaerella* ha sido utilizado como un concepto amplio y general para denominar a una amplia gama de especies, que tienen pequeños ascostromas, con ascosporas con un solo septo y sin pseudoparáfisis (Aptroot, 2006). Este género estaba vinculado como teleomorfo con más de 40 anamorfos diferentes (Crous, 2009). Sutton (1980), afirmó que el género es heterogéneo presentando grandes variaciones morfológicas. Puede formar conidiomatas que varían desde acérvulos a picnidios. La conidiogénesis es blástica simpodial con proliferación percurrente o fialídica con engrosamiento periclinal (Quaedvlieg *et al.*, 2011).

El análisis filogenético de 64 especies del orden Capnodiales mostró un agrupamiento diferente al obtenido a partir de caracteres morfológicos. Se observó que la mayoría de las especies de *Septoria* se agruparon en un clado bien definido, denominado *Septoria* s.str. (Quaedvlieg *et al.*, 2011). Éste, es más cercano al género *Cercospora* en la familia Mycosphaerellaceae (Groenewald *et al.*, 2006). Otro clado, monofilético, hace referencia a *Zymoseptoria* gen. nov, incluyendo a *S. tritici* y *S. passerinii* junto con otras dos especies de este género. Éste nuevo género se distingue por su tipo de crecimiento levaduriforme en medio de cultivo in vitro y la formación de diferentes tipos de conidios que están ausentes en el clado *Septoria* s.str (Quaedvlieg *et al.*, 2011).



Fig.2 Colonias de *S. tritici* cultivadas en agar malta. Aumento 2x

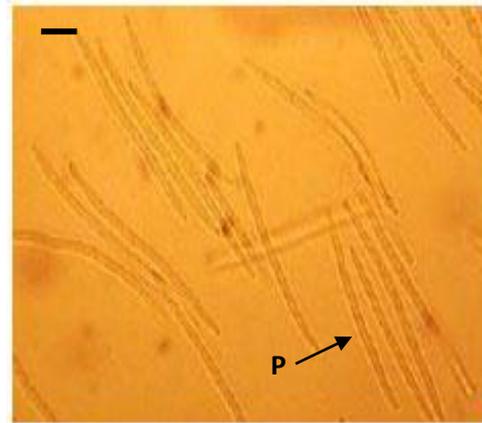


Fig.3 Observación microscópicas de picnidiospora de *S. tritici* (Eyal et al., 1987). Detalles de las Picnidiospora (P).



Fig.4. Observación microscópica de conidios secundarios de *Septoria tritici* con un aumento de 100x. Detalles de los conidios secundarios (CS).

Por lo tanto, *S. tritici* agente causal de la MHT pertenece al clado *Zymoseptoria*, denominándose *Zymoseptoria tritici* (teleomorfo *M. graminicola*), enfermedad que está presente en las principales zonas de cultivo de trigo.

2.2.6 Sintomatología

Los síntomas se desarrollan a través de toda la estación de crecimiento e inicialmente aparecen manchas foliares pequeñas, cloróticas, irregulares, usualmente en las hojas inferiores (Perelló *et al*, 1988), a los 5 a 6 días después de la inoculación, con humedad relativa elevada y temperaturas entre los 18 y 24°C (Eyal & Brown, 1976). Luego, las manchas cloróticas se expanden y alcanzan 1-5 x 4-15 mm. Las lesiones, tienden a desarrollarse longitudinalmente y a estar restringidas por las nervaduras de la hoja. Conforme evoluciona la enfermedad, los centros de las manchas adquieren un color ceniza, apareciendo las lesiones necróticas (tejido muerto) en las áreas cloróticas. Estas lesiones se extienden y se expanden sobre toda la hoja y con frecuencia resultan en una necrosis completa. (Eyal & Brown, 1976; Perelló *et al.*, 1988).

Después de los 15 días de la inoculación, comienza la formación de picnidios que se desarrollan en las lesiones necróticas y pueden situarse tanto en el haz como en el envés de la hoja, extendiéndose por toda la lesión. Estas fructificaciones asexuales representan el signo de la enfermedad. Su tamaño varía según las variedades y depende también del número de picnidios ya que a medida que aumentan, suelen ser más pequeños (Eyal & Brown, 1976). La producción de picnidiosporas puede estar relacionada con la respuesta de la variedad, pues hay menos producción en las variedades resistentes (Gough, 1978).

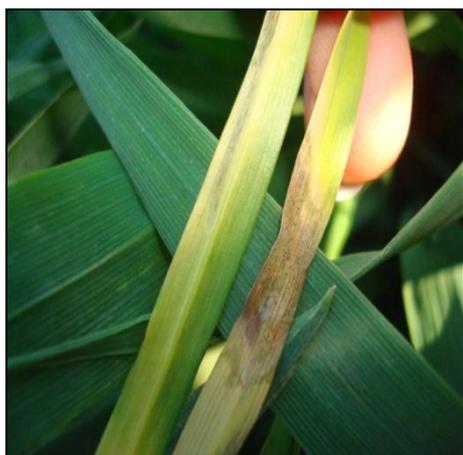


Fig. 4 Lesiones necróticas con picnidios (puntos negros) producidos por *S. tritici* en las hojas inferiores de *T. aestivum* (Gentileza N. Castillo)



Fig. 5 Lesión necrótica con picnidios en hoja bandera de trigo (Gentileza C. Cordo)



Fig. 6 Lesión de *S. tritici* con picnidios en la primera hoja de trigo.

Los requerimientos nutricionales de los hongos patógenos determinan en qué forma sobreviven de una estación de cultivo a otra. En base a ello, podemos clasificar a los mismos en dos grupos: los biotróficos y los necrotróficos (Grant & Long, 1989). Los biotróficos, son los que poseen una sola fase en su ciclo de vida, la parasítica. Son parásitos obligados y dependen de la planta viva para nutrirse. Los necrotróficos matan los tejidos vivos y se alimentan del tejido muerto.

S. tritici es un hongo hemibiótrofo (Royle *et al.*, 1986; Kema & van Silfhout, 1996; Parbery, 1996), ya que inmediatamente después de la penetración, las hifas colonizan los espacios intercelulares sin causar la muerte de las células por un período de 3 semanas antes de que ocurra la necrosis y la esporulación. Además, está incluido dentro de los “casi enteramente dependientes” del rastrojo y por lo tanto es afectado por la siembra directa. Al no presentar estructuras de resistencia en el suelo, su supervivencia está casi condicionada a la colonización de los tejidos durante el ciclo del cultivo, antes de que haya terminado el proceso de senescencia o muerte natural de la planta (Stewart *et al.*, 2002).

2.2.7 Ciclo biológico de la enfermedad

El inóculo primario que inicia las epifitias, está constituido por las ascosporas, transportadas por el viento (Eyal *et al.*, 1987). Mientras que el principal mecanismo de dispersión de las picnidiosporas se da a través de la salpicadura producida por las gotas de lluvia. *M. graminicola* es capaz de completar varios ciclos sexuales por temporada. Por lo tanto, el progreso de la enfermedad después del establecimiento de la misma no depende solo de la dispersión los conidios asexuales por las gotas de lluvia (Shaw & Royle 1989; Royle, 1994). Existe también un proceso policíclico de propágulos en el aire con una constitución genética diferente en cada generación. La importancia relativa del proceso sexual policíclicos en comparación con la difusión de

las esporas asexuales, radica en el aumento de la estructura genética de la población. Las ascosporas son transmitidas por el aire, y su descarga se inicia por los cambios en la humedad relativa, que no son necesariamente debidos a la lluvia, sino también por el rocío y la niebla (Sanderson *et al.*, 1985).

Algunos otros autores (Spalding *et al.*, 1961; Wiese & Ravenscroft, 1973) mencionaron también que las ascosporas se liberan en dos momentos pico del año: el primero establece las infecciones primarias en los cultivos de trigo recién sembrado y el segundo coincide aproximadamente con la aparición de las dos hojas superiores. Esto hace posible que la infección se produzca en las hojas superiores sin lluvia (Simón *et al.*, 2012a).

A pesar de que la forma sexual se ha encontrado en varios países, es su forma asexual la que causa la mayoría de los síntomas de la enfermedad y las pérdidas de rendimientos en el cultivo de trigo (Eyal *et al.*, 1987).

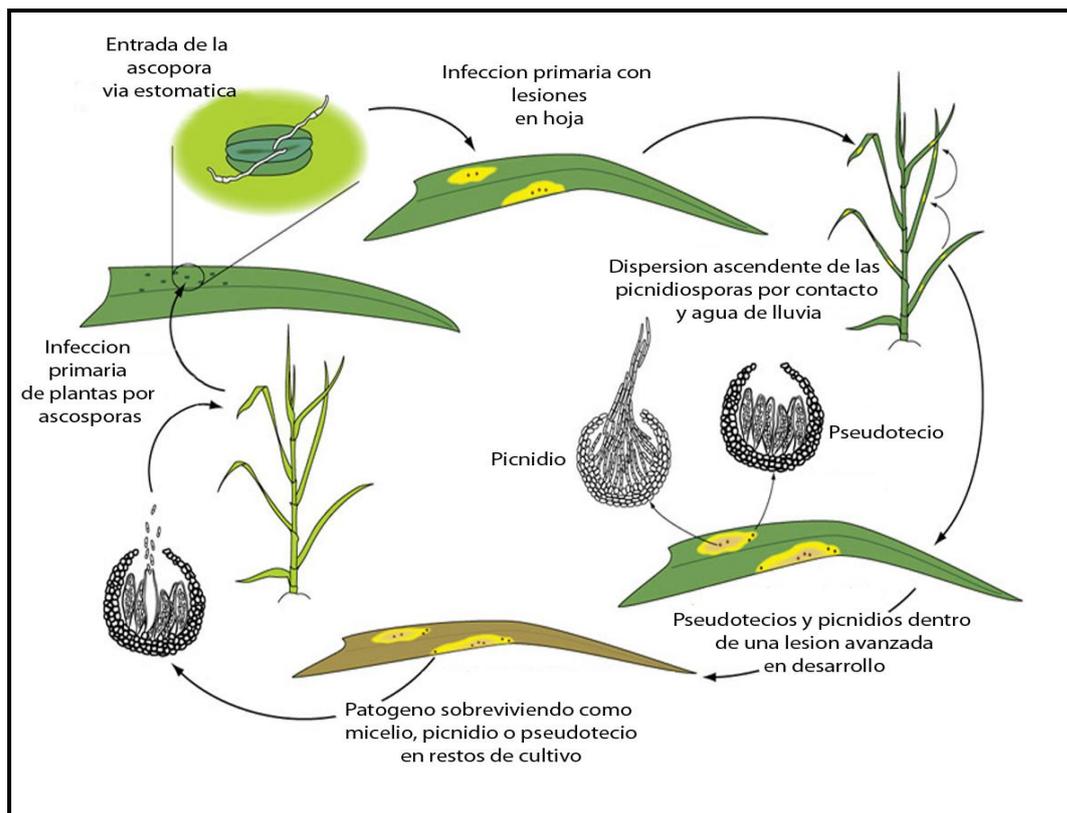


Fig 7 Ciclo Biológico de la "septoriosis" del trigo

Después que las picnidiosporas son liberadas, germinan sobre las hojas, cuando las plantas están húmedas. La germinación se produce mediante el alargamiento de la célula apical o por gemación. El hongo puede penetrar en la hoja por los estomas o, directamente, a través de las paredes celulares de la epidermis (Kema *et al.*, 1996).

La humedad es necesaria en todas las etapas del proceso de infección: germinación, penetración, desarrollo del micelio dentro del tejido de la planta y posterior formación de picnidios (Hooker, 1957; Browning, 1979; Shaner, 1981).

Los síntomas se desarrollan a través de toda la estación de crecimiento e inicialmente aparecen manchas foliares pequeñas, cloróticas, irregulares. Los procesos de infección se producen mejor en días nublados y lluviosos, con temperaturas entre 20 y 25°C. Las picnidiosporas germinan en un medio húmedo, por lo general en agua libre, después de la exudación del picnidio en días lluviosos y/o con rocío abundante. Para la germinación y penetración se requieren temperaturas óptimas entre 15 y 25°C y al menos seis horas de humedad relativa para que se produzca una infección adecuada (Scharen & Krupinsky, 1970). Los síntomas suelen aparecer después de 14 a 21 días (Eyal *et al.*, 1987).

La infección sigue la elongación del tallo hacia las hojas superiores del cultivo por las picnidiosporas dispersadas por salpicadura de las gotas de lluvia. Otra forma de dispersión, en ausencia de gotas de lluvia, está influenciada por la posición del estrato de hojas en contacto con las hojas infectadas (Lovell *et al.*, 1997). Este fenómeno ocurre en cultivares de canopeo compacto, en los que en un corto tiempo las hojas nuevas pueden estar en posición inferior o a la misma altura que las hojas infectadas. El inóculo, incluso sin agua de lluvia, puede ser transferido a las hojas superiores a medida que ascienden las hojas nuevas. El movimiento del inóculo dentro de la zona de solapamiento entre las hojas sanas y enfermas necesita mucho menos energía cinética.

3. Manejo de la enfermedad

La inestabilidad de la productividad de los cultivos agrícolas, la mayoría de las veces, está relacionada con las condiciones climáticas favorables para la ocurrencia de enfermedades. El control de los patógenos involucra medidas que aumentan el costo de la producción y, consecuentemente, reducen el lucro de la actividad agrícola. Esta amenaza a la sustentabilidad económica ha llevado a que los productores

apliquen el manejo integrado de enfermedades. En éste se emplean todas las tácticas disponibles teniendo siempre presente el retorno económico y la sustentabilidad ecológica, respetando como principio la racionalización del uso de agroquímicos (Reis *et al.*, 2002). Según INTA-FAO, (1979) un sistema de manejo de enfermedades, en el contexto del medio ambiente asociado (agroecosistema) y de la dinámica de la población de los patógenos, utiliza todas las técnicas disponibles para mantenerlas a niveles inferiores a aquellos que causan daño económico al cultivo.

Desde hace algunos años los efectos negativos de las enfermedades sobre el rendimiento y la calidad del trigo se han incrementado debido, entre otras causas, a la expansión de la siembra directa sin rotación de cultivos, la difusión de genotipos susceptibles y el uso de semillas infectadas. Nos encontramos frente al crecimiento de conocidas enfermedades foliares y a la amenaza de otras nuevas.

El manejo integrado de enfermedades se basa en la resistencia genética conjuntamente con prácticas culturales (rotaciones, laboreos de suelo, ajuste de la fecha y época de siembra, elección correcta de genotipos, manejo de la fertilización) aplicación de fungicidas, calidad de la semilla y control biológico (Reis *et al.*, 2002; Mónaco, 2002; Carmona, 2004; Simón, 2007; Perelló, 2007; Perelló *et al.*, 2008).

En los últimos años, la gran mayoría de las decisiones de control de enfermedades en el cultivo de trigo se toman mediante el uso de umbrales de acción, definido como nivel de enfermedad (incidencia: proporción de hojas enfermas o severidad: proporción de área foliar enferma) que justifica económicamente su control Munford & Norton (1984). Estos umbrales se construyen a partir de información empírica (ensayos) que evalúan la pérdida de rinde que originan diferentes niveles de enfermedades (Gaunt, 1995).

Es importante conocer la influencia de la enfermedad en el estadio de crecimiento del cultivo en que ocurre la infección, dado que un mismo nivel de enfermedad tendrá un impacto diferente sobre el rinde, dependiendo del estadio de crecimiento en que encuentre el cultivo. A su vez mantener una alta tasa de crecimiento (hojas verdes y sanas) durante la etapa de llenado de granos resulta en un aumento del rinde (Carretero, 2010).

3.1. Prácticas culturales

El rastrojo en superficie no sólo funciona como reservorio de esporas, sino que además induce a ciertos hongos a reproducirse sexualmente (Ingold, 1964). Este tipo de reproducción no sólo representa una nueva fuente de inóculo primario y secundario bajo labranza cero, sino que, es a partir de ella que se crean nuevas recombinaciones genéticas del hongo, generándose así nuevos biotipos. Cuanto mayor sea la intensidad de las enfermedades causadas por patógenos necrotróficos en el cultivo previo, mayor será la probabilidad de que el rastrojo proveniente del mismo esté contaminado (Cook *et al.*, 1978). La rotación de cultivos disminuye el inóculo inicial y va a ser más efectiva dependiendo del patógeno en cuestión. Cuanto más específico sea el hongo y cuanto más limitada sea su capacidad de dispersión, mayor será la probabilidad de controlarlo por rotación. En el caso de *S. tritici*, la rotación con cultivos no hospedante y el laboreo del suelo reducen la cantidad de inóculo disponible sobre el rastrojo evitando que se reinicie un nuevo ciclo de la enfermedad. Esto puede ser menos eficaz en el campo, debido a la dispersión a larga distancia de ascosporas, pero puede ser útil si se coordinan dentro de una región.

En aquellos sistemas de labranza conservacionista, que durante la siembra al menos dejan el 30% de la superficie del suelo cubierto con rastrojos (Lafond & Derksen, 1996) la severidad de los patógenos transmitidos por residuos tiende a aumentar. La labranza reducida puede bajar las poblaciones de *B. sorokiniana*, pero aumentar las poblaciones de *Fusarium* spp. en las raíces del trigo.

En siembra directa y monocultivo los patógenos hemibiótrofos son más severos, debido a que aumenta el período de supervivencia sobre los rastrojos retenidos en el suelo. El trigo debería ser cultivado en el mismo lote, sólo después de la completa mineralización de los restos culturales. Por eso, el conocimiento del tiempo en que el rastrojo del trigo persiste en el suelo en diferentes prácticas culturales y bajo diferentes ambientes, es de fundamental importancia (Gómez *et al.*, 2008). Gómez *et al.*, (2008) estudiaron el efecto del tiempo y la influencia del ambiente para una total mineralización del rastrojo de trigo infectado para controlar la MHT. Los autores concluyeron que para asegurar una siembra futura del cultivo, con una población disminuida del patógeno de la MHT, la condición no disturbada acelera la descomposición del rastrojo bajo monocultivo de trigo. Se alcanzó la degradación total a los 13 meses de exposición del rastrojo en siembra directa y con dos dosis de

fertilizante. En cambio, en un sistema bajo labranza convencional, se necesitaron 21 meses para lograr la degradación total del rastrojo.

Bailey *et al.* (2001) en Canadá demostraron que el aumento de la diversidad de cultivos en las rotaciones redujo las poblaciones de *Bipolaris sorokiniana* y *S. tritici*, sin embargo en la sucesión de cultivo trigo y el lino en una rotación, aumentó la incidencia de *Fusarium spp.* en el cereal.

La elección de cultivares resulta de mucha importancia a la hora de tomar decisiones, por lo cual una estrategia muy útil y atractiva para la elección de los genotipos es la de consultar anualmente el perfil y riesgo sanitario de los mismos elaborado en base a la historia genética y al comportamiento a campo de cada variedad (Annone & García, 2005). Se deben utilizar cultivares que equilibren rendimiento con buen comportamiento frente a enfermedades.

Eyal *et al.* (1987) estudiaron que los grados bajos de infección de *S. tritici* y de *S. nodorum*, se asociaron con la madurez tardía y la altura elevada de la planta de trigos. En otros países una situación de escape a la ocurrencia de la enfermedad se da cuando las lluvias finalizan tempranamente, en la temporada de cultivo y/o las temperaturas aumentan con rapidez, conduciendo a que las plantas no sufran la infección.

Otro aspecto a tener en cuenta es la resistencia según el tipo de trigo. Las variedades de trigo harinero de invierno son más susceptibles que los trigos de primavera a la MHT y a la “mancha de la hoja y glumas”. Por su parte Williams & Jones (1973), Brokenshire (1975), Wilson (1985) registraron resistencia en varias especies silvestres afines al trigo.

El efecto de la fertilización nitrogenada ha presentado resultados disímiles sobre este patógeno. Algunos trabajos señalaron que la fertilización nitrogenada incrementó la severidad de la MHT (Prew *et al.*, 1983, Broschius *et al.*, 1985, Howard *et al.*, 1994, Leitch & Jenkins, 1995), en tanto que otros encontraron incrementos o reducciones en la severidad de la enfermedad dependiendo de las condiciones de los experimentos (Johnston *et al.*, 1979, Arama, 1996, Simón *et al.*, 2002, 2003). Lovell *et al.* (1997), al igual que varios estudios que comparan las tasas de aplicación de Nitrógeno en trigo de invierno (Prew *et al.*, 1983; Leitch & Jenkins, 1995), encontraron menos enfermedades en los cultivos que reciben menos nitrógeno. Esto se debe a que la baja concentración de nitrógeno en los cultivos los vuelven senescentes con mayor

rapidez, por lo que el área foliar verde se convirtió en limitante el progreso de la enfermedad. Por todo lo anterior, el efecto del nitrógeno sobre la MHT estaría influenciado por el clima, el tipo de suelo, la dosis de N aplicada, la estructura del canopeo, cultivos previos, tiempo de aplicación, resistencia del cultivar y el inóculo inicial (Johnston *et al.*, 1979; Prew *et al.*, 1983; Hayden *et al.*, 1994; Leitch & Jenkins, 1995; Arama, 1996; Simón, 2003).

Por otro lado, el movimiento de semilla infectada representa el vehículo para que esta enfermedad pueda ser dispersada a cortas y largas distancias (Banke & McDonald, 2005). Recientemente, se ha determinado a través de técnicas moleculares la presencia de *S. tritici* en la semilla de trigo (Consolo *et al.*, 2009) lo que indica la posibilidad de su transmisión a plántula. Aunque hay evidencias de la presencia de *S. tritici* en semilla, es dudosa la importancia de la semilla como fuente de inóculo en el ciclo de la enfermedad ya que es un parásito de baja capacidad competitiva, resultando eliminado o enmascarado por los microorganismos más competitivos en los actuales métodos de detección (Carmona *et al.*, 1999).

3.2. Control químico

El control químico o quimioterapia constituye una herramienta muy útil que debe formar parte de una estrategia definida de manejo integrado de las enfermedades. La aplicación eficiente de fungicidas ha demostrado en muchos cultivos, aumentos significativos de los rendimientos y de la calidad de la producción (Carmona *et al.*, 2013 en prensa). Desde el punto de vista epidemiológico, el uso de fungicidas puede reducir el inóculo inicial (Ej. tratamiento de semillas) y/o disminuir la tasa de infección (aplicación foliar). Esta técnica debe ser usada racionalmente para asegurar el retorno económico de la aplicación y evitar contaminaciones innecesarias. Como sugerencia es importante recordar, que los fungicidas no deben aplicarse preventiva ni tardíamente, solamente deben ser aplicados cuando los valores de una determinada enfermedad alcanzan el umbral de daño de acción (Carmona & Reis, 2001).

La respuesta al control químico es función entre otros factores del comportamiento sanitario del cultivar. Normalmente, los materiales categorizados como resistentes o moderadamente resistentes no requieren aplicación de fungicidas para esa enfermedad en particular y no presentarán respuesta en rendimiento a la aplicación. Por otra parte en cultivares altamente susceptibles, la mayor respuesta se obtiene mediante la aplicación de fungicidas con mayor eficiencia de control y

residualidad (mezclas de triazol y estrobilurina) al momento de aparición de primeros síntomas (Pereyra & German, 2012).

Las semillas infectadas por un patógenos es una excelente vía para la introducción de enfermedades en países o campos donde antes no existían. A través del tratamiento de semillas se busca evitar la introducción de aquellos patógenos, así como la de diseminación de nuevas razas de los mismos.

El tratamiento foliar de las manchas registran mayor dificultad para su control (Reis & Carmona, 2006). Algunos triazoles aumentando su dosis mejoran su fungitoxicidad a bajos niveles de infección en semilla y otros fungicidas tales como iprodione, guazatine e iminoctadine resultan aún más específicos. Se debe destacar que el iminoctadine y el iprodione son actualmente las moléculas más fungitóxicas para los géneros fúngicos *Alternaria*, *Bipolaris* y *Drechslera*.

Para las manchas foliares y la roya de la hoja se utilizan los fungicidas sistémicos del grupo químico de los triazoles, combinados con los principios activos derivados de las estrobilurinas cuya mezcla ofrece una medida muy segura de control en los cultivares susceptibles. Durante los últimos años se registraron cambios en la sensibilidad a los triazoles a algunas razas de roya naranja (Reis & Carmona, 2011) debiéndose aumentar considerablemente su dosis para lograr control. Por eso actualmente se recomienda en trigo el uso de triazoles más estrobilurina como la mejor opción en el manejo de las enfermedades foliares del trigo (Reis *et al.*, 2010). La eficiencia de control de los diferentes productos disponibles (en las dosis recomendadas) en el mercado dependen de la enfermedad a controlar. Al igual que los autores anteriores Pereyra & German (2012) recomendaron para el tratamiento de cultivares altamente susceptibles, aún en el caso de las roya de la hoja, las mezclas de triazol y estrobilurina. Estas presentan una mayor eficiencia de control general para todas las enfermedades foliares. El mecanismo de acción de los triazoles involucra moléculas de acción sistémica. Afectan las membranas de los hongos patógenos inhibiendo la síntesis de los esteroides presentando efectividad de acción sobre patógenos foliares (manchas, oídios y royas) y algunos para fusariosis. Las estrobilurinas son de acción oligosistémica. Alteran procesos respiratorios en mitocondrias e inhiben la respiración mitocondrial debido al bloqueo de la transferencia de electrones en el complejo del citocromo-bc (Pastore, 2009).

3.3. Resistencia genética

Los cultivares resistentes siempre han sido un componente esencial del manejo integrado de las enfermedades de trigo. La incorporación de genes de resistencia ha sido muy exitosa para enfermedades biotróficas como la roya negra o la roya anaranjada y más dificultosa para las enfermedades necrotróficas como la fusariosis o la septoriosis.

En general, la resistencia a la MHT es escasa en las variedades comerciales que poseen buenas características agronómicas, sin embargo en diversos materiales se ha detectado resistencia cuantitativa y cualitativa (Jlibene *et al.*, 1994; Simón & Cordo, 1998; Brading *et al.*, 2002). Es conocido que ambas resistencias coexisten en el patosistema *M. graminicola*–*T. aestivum*. La resistencia cuantitativa está condicionada por polígenes, es parcial o incompleta, aislamiento no-específica y de alta durabilidad (Jlibene *et al.*, 1994; Simón & Cordo, 1998; Chartrain *et al.*, 2004). En cambio, la resistencia cualitativa, está condicionada por uno o pocos genes, es completa y en general de menor durabilidad (Somasco *et al.*, 1996; Arraiano *et al.*, 2001; McCartney *et al.*, 2001; Brading *et al.*, 2002). Se encontró resistencia condicionada por uno o dos genes en algunos materiales (Narváez & Caldwell, 1957; Rillo & Caldwell, 1966; Rosielle & Brown, 1979; Lee & Gough, 1984; Bradding *et al.*, 1999), mientras que en algunos otros se han confirmado al menos tres genes de resistencia (Rosielle & Brown, 1979).

Por otro lado, otras especies de trigo son importantes fuentes de resistencia. Una de ella, para realizar cruzamientos con *T. aestivum* en programas de mejoramiento, lo constituye el trigo espelta (*T. aestivum* L. *subsp. spelta* (L.) Thell), estrechamente relacionado con el trigo pan. Este es un cultivo alternativo con requerimientos de crecimiento poco exigentes que muestra una muy buena adaptabilidad (Laghetti *et al.*, 1999) y mejor comportamiento en altura que el trigo pan (Ruegger & Winzeler, 1993). Representa una fuente de resistencia genética a diversas enfermedades, incluida la roya del tallo (McVey & Leonard 1990), la roya amarilla (Kema, 1992) y la MHT (Simón *et al.*, 2005). Además es fácilmente cruzable con el trigo pan, proporcionando los recursos genéticos de interés para el mejoramiento de éste.

Durante la última década, se han identificado 18 principales genes que confieren resistencia a los patógenos. Además, varios QTL que también fueron encontrados en los cromosomas. La resistencia de algunos cultivares argentinos estarían asociadas a un QTL situado en una región del cromosoma 4AL que albergan los genes STB7 o Stb12 (Simón *et al.*, 2012). Estos avances son muy importantes, sin embargo, todavía en Argentina se conoce poco acerca de los genes de resistencia y la forma en que son eficaces contra la población del patógeno. El conocimiento acerca de la localización precisa de los genes y la identificación de marcadores moleculares ligados a los mismos, son importantes herramientas para la selección en programas de mejoramiento, sin la necesidad de inoculaciones con el patógeno (Simón, 2003).

3.4. Control biológico

Tradicionalmente el productor agropecuario aplica fungicidas en altas dosis y frecuencias para el control de las enfermedades causadas por hongos, eliminando una gran cantidad de especies fúngicas, la mayoría saprófitas. Este vacío provoca un riesgo de reinvasión por parte de los patógenos ante las pérdidas del efecto amortiguador que le opone la flora saprobia. La consecuencia de la eliminación de los saprobios naturales ha forzado a la utilización de fungicidas cada vez más potentes, lo que significa una mayor agresión al ecosistema y la presencia de altos niveles de residuos en productos cosechados (Mónaco, 2002). Otras de las consecuencias del excesivo uso de agroquímicos, además de los altos costos en la producción, es la contaminación ocasionada al ambiente (suelos, aire, agua) y los problemas de toxicidad para el hombre y los animales, además del exterminio de la fauna benéfica (Butt *et al.*, 2001).

El control biológico o biocontrol, según la definición de Cook & Baker (1983), “es la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, ya sea en su estado activo o latente, mediante uno o más organismos, lograda en forma natural o a través del manejo de las condiciones ambientales, del hospedante o de los antagonistas autóctonos, o por la introducción de uno o más microorganismos antagónicos.”

El control biológico incluye el uso de microorganismos benéficos, tales como hongos (Dal Bello *et al.*, 2001, Perelló *et al.*, 2001, 2004), bacterias (Perelló *et al.*, 2001a) y nematodos, los cuales atacan y controlan a patógenos de plantas. Muchos de los antagonistas más efectivos son autóctonos y están adaptados ecológicamente al cultivo, mientras que otros denominados exóticos han sido introducidos desde

regiones geográficas lejanas al sitio de aplicación. Además, existen antagonistas de especies saprófitas distintas a la del hongo patógeno y también de su misma especie o relacionadas taxonómicamente, pero de razas avirulentas o débilmente patógenas. El hallazgo de microorganismos benéficos como potenciales biocontroladores es un proceso de ensayo y error. La experiencia acumulada indica que fuentes útiles se encuentran principalmente en suelos supresivos de la enfermedad y plantas sanas de áreas endémicas (Dal Bello & Mónaco, 2013 en prensa).

Un organismo para ser usado como biocontrolador debe ser: 1) genéticamente estable, 2) eficaz para un amplio rango de patógenos, aún a bajas concentraciones 3) Poseer requerimientos nutricionales simples y desarrollar en sustratos pobres. 4) sobrevivir en condiciones adversas, 5) no producir metabolitos potencialmente tóxicos para el hombre, animales o plantas, 6) resistir a los pesticidas de uso frecuente y 7) ser compatible con otros tratamientos químicos o físicos. (Wilson *et al.*, 1991; Cabrifiga Olamendi, 2005).

La información que existe acerca de las posibilidades de biocontrol de patógenos fúngicos de cereales es un campo que se continúa explorando aún en Argentina (Perelló *et al.*, 1994; 1997,1998; Alippi *et al.*, 2000; Perelló *et al.*, 2001; Perelló *et al.*, 2002; 2003, 2004; Perelló *et al.*, 2006, 2009, Cordo *et al.*, 2007).

La combinación de los agentes de control biológico con niveles reducidos de productos químicos (control integrado) promueve la reducción de las enfermedades de manera similar al tratamiento tradicional (Monte, 2001; Jeque *et al.*, 2008; Cordo *et al.*, 2011, 2012). Otros autores (Lorito *et al.*, 1992, 1993, 1994) demostraron la acción sinérgica entre los compuestos enzimáticos involucrados en el mecanismo de biocontrol y la acción de los fungicidas más ampliamente usados.

4. Hongos biocontroladores: Género *Trichoderma*

Trichoderma es un género de hongos con reproducción asexual (anamorfo), cuyas cepas se aíslan de casi todos los suelos templados y tropicales. Además, colonizan la madera y los restos de vegetales herbáceos en los que se encontró la forma sexual *Hypocrea* (teleomorfo). Los teleomorfos *Hypocrea* y los géneros relacionados fueron estudiados exhaustivamente por Doi (1972) quien también describió cuidadosamente la asociación con el anamorfo. En este estudio, en general, no fue posible correlacionar los anamorfos con teleomorfos en forma individual. Cada uno de las especies agregadas de Rifai (1969) podría conectarse con varias especies

teleomórfica. Los anamorfos difícilmente se pueden distinguir en los cultivos de *Hypocrea* (Domsch *et al.*, 2007). Por lo tanto muchas cepas, incluyendo la mayoría de las biocontroladoras, no tienen fase sexual conocida.

Las especies de *Hypocrea* y *Trichoderma* son manifestaciones de los mismos organismos. Han sido clasificadas como géneros diferentes. Los anamorfos de *Hypocrea* se han clasificado principalmente en el género *Trichoderma*, mientras que unas pocas especies lo han hecho en otros géneros, como *Gliocladium* Corda o *Stilbella* Lindau (Seifert & Samuels, 1997; Rossman, 2000). En la actualidad el género se concibe como saprótrofo, habitante del suelo, de rápido crecimiento, con micelio verde o blanco, con fiálides hialinas, unicelular, conidios verdes o hialinos. Sin embargo, los conidióforos son difíciles de definir, y las diferencias específicas son difíciles de cuantificar (Jaklitsch, 2009). Esta puede ser una razón por la cual existe una discrepancia evidente entre el número de nombres establecidos en *Hypocrea* y los de *Trichoderma*. Con el surgimiento de las técnicas que utilizan la secuencia de ADN la sistemática de hongos evolucionó. Se incorporaron rápidamente los datos de secuencia de ADN para el desarrollo de la taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea* (Samuels, 2006). Rehner & Samuels (1994) demostraron que *Trichoderma* es filogenéticamente indistinguible de *Hypocrea*. Con los avances proporcionados por los estudios moleculares se determinó un número creciente de especies de *Trichoderma* que han sido relacionadas con teleomorfos *Hypocrea*, como *T. harzianum*, el anamorfo de *H. lixii* (Chaverri & Samuels, 2002), o *T. virens*, el anamorfo de *H. virens* (Chaverri, *et al.*, 2001). Sin embargo, algunas especies importantes como *T. asperellum* no se han relacionado con un teleomorfo y son aparentemente clonales.

En la naturaleza, las formas asexuales de los hongos persisten como clones, frecuentemente heterocariótico. Probablemente los individuos y las poblaciones evolucionan de forma independiente bajo la forma asexual del hongo. Las cepas de *Trichoderma* muestran un alto nivel de diversidad genética, y se pueden utilizar para producir una amplia gama de productos de interés comercial y ecológico (Harman *et al.*, 2004).

4.1 Clasificación taxonómica

Dentro de la clasificación taxonómica, el género *Trichoderma* pertenece al Reino Fungi (Hongos verdaderos), Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina; Clase Sordariomycetes (antes Pyrenomycetes), Orden Hipocreales, Familia Hipocreaceas. Caracterizados por tener ascos unitunicados en peritecios,

El género *Trichoderma* se propuso por primera vez por Persoon en 1794 sobre la base de un material recogido en Alemania. Persoon incluyó cuatro especies y encontró dificultades para reconocer las diferencias entre ellas (Samuels, 2006).

Las primeras clasificaciones, basadas en criterios morfológicos del Género *Trichoderma*, pertenecen a Rifai (1969) y a Bissett (1984, 1991, 1991a, 1991b, 1992). Rifai (1969) propone el concepto de "especie agregada", una entidad que puede definirse como agregaciones de especies morfológicamente muy similares y con frecuencia apenas separable. De esta manera su clasificación se dividió en nueve "especies agregadas". Se basó en la variabilidad de *Trichoderma* y el crecimiento reducido en medios de cultivo de muy pocas especies de *Hipocrea*.

Bissett en 1991, llevó a cabo una revisión de la clasificación de *Trichoderma* propuesta por Rifai. Determinó que algunas de las especies agregadas de Rifai pasaran a formar secciones y dentro de estas secciones, reconoció las especies biológicas. En lugar de nueve especies agregadas, determinó cinco secciones (Samuel, 2006). Estas secciones son: TRICHODERMA, PACHYBASIIUM, LONGIBRACHIATUM, SATURNISPORUM e HYPOCREARUM.

La introducción de la filogenia de genes, ha aumentado rápidamente número de especies. Los primeros estudios se basaron en secuencias ITS (Kindermann *et al.*, 1998; Lieckfeldt *et al.*, 1998; Dodd *et al.*, 2000). Más tarde se añadieron otros genes, incluyendo aquellos que codifican 18S y 28S del ARN ribosomal, el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*), endoquitinasa (*chi18 - 5 = ech42*) (Lieckfeldt *et al.*, 2000; Kullnig - Gradinger *et al.*, 2002), *rpb2* (Chaverri *et al.*, 2003a), actina (*act*) y calmodulina (*cal1*) (Samuels *et al.*, 2006, Jaklitsch *et al.*, 2008). Varios estudios han demostrado consistentemente, que los factores de la elongación (*tef1*), proporcionan el más alto poder de resolución dentro de los clados (Samuels, 2006, Jaklitsch *et al.*, 2006a, b).

En la actualidad, los estudios moleculares apoyan la taxonomía propuesta por Bissett (1991), basada en caracteres morfológicos, pero determinan que dos de las secciones que se proponen, Sección Longibrachiatum (que incluye *T. reesei* y *Hypocreanum*) son filogenética y morfológicamente homogéneas a la Sección Saturnisporum y se ha fusionado a la Sección Longibrachiatum (Samuels, 1996, 2006). Las secciones dentro del género *Trichoderma* quedarían definidas: PACHYBASIIUM (*T. harzianum* y *T. virens*), TRICHODERMA (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride*), LONGIBRACHIATUM (*T.*

longibrachiatum y *T. saturnisporum*) e HYPOCREARUM (estados anamórficos de *Hypocrea*). Las especies de las dos primeras secciones constituyen las principales especies utilizadas en control biológico. No obstante, el número de especies contenido en cada una de las secciones depende de los continuos cambios que sufre su sistemática.

A partir de los análisis moleculares, se hizo evidente que las secciones subgenéricas de *Trichoderma* como se definen por Bissett (1991), en particular sección *Pachybasium*, son filogenéticamente heterogéneo (con excepción de la sección *Longibrachiatum*), pero pueden ser todavía utilizadas como términos descriptivos para la morfología de conidióforos, y en parte, para estudios de filogenia (sec. *Longibrachiatum*, secc. *Hypocreanum*) (Jaklitsch, 2009).

Un enfoque importante para la identificación de especies *Hypocrea/Trichoderma* es el desarrollo de un código de identificación por oligonucleótidos (TRICHOKEY, Druzhinina *et al.*, 2005) con su software de aplicación respectivo disponible en www.isth.info. Esto permite la identificación de la mayoría de las especies dentro de *Hypocrea/Trichoderma*, basado en la combinación de ciertos marcadores, secuencias del ITS1 e ITS2, obtenidos por un análisis exhaustivo de estas secuencias, compilado en una base de datos. La ventaja de este sistema es que esta base de datos no contiene el número sustancial de secuencias procedentes de especies identificadas erróneamente como posee el GenBank. Además, la búsqueda TRICHOBLAST rutina de similitud (Kopchinskiy *et al.*, 2005) disponible en www.isth.info se basa en ITS, *tef1* y *rpb2* secuencias de especímenes que proporciona una identificación más fiable de *Hypocrea/Trichoderma* que GenBank.

Los últimos estudios sobre determinaciones y descripciones de las especies de *Trichoderma* se realizaron por Jaklitsch (2009, 2011) sobre especies encontradas en Europa. Este autor dividió la taxonomía del género *Hypocrea* en dos partes, según la coloración de las esporas. En su estudio, Jaklitsch (2011) describió todas las especies de *Hypocrea* que poseen esporas hialinas encontradas en Europa. Jaklitsch (2009) describió con detalle 19 especies de *Hypocrea* con ascosporas verdes, incluyendo seis nuevas especies de anamorfo y 6 nuevas de teleomorfo. En total se han identificado 75 especies de *Hypocrea* encontradas en zonas templadas de Europa. Estudió la morfología de estromas frescos y secos. Los cultivos se prepararon a partir de ascosporas y se utilizaron para estudiar la morfología del anamorfos. Determinó las tasas de crecimiento y realizó extracciones de ADN que se utilizaron para la

amplificación y la secuenciación de tres marcadores genéticos. Se utilizó ITS para la identificación, mientras que la subunidad b de la ARN polimerasa II (*rpb2*) y factor de la elongación de la traducción 1 α (*tef1*) fueron analizados para la reconstrucción filogenética del género. En este estudio Jaklitsch (2009) logró comprobar que: 1) lo que se creía hasta el momento que solo un pequeño número de especies de *Trichoderma* forma un teleomorfo, es errónea. 2) las expectativas en cuanto al número de especies en Europa son mucho mayores. Setenta y cinco especies de *Hypocrea*, dos especies de *Protocrea* y *Arachnocrea stipitata*, en este documento se identifican en zonas templadas de Europa. 3) Los datos actuales sugieren que la biodiversidad de *Hypocrea/Trichoderma* encima del suelo excede el número de especies aisladas de suelo 4) el número de especies de *Trichoderma* que forman conidios hialinos se ha considerado una fracción pequeña. En Europa, 26 especies de las que forman teleomorfos producen conidios hialinos, mientras se conocen 42 especies de conidios verdes. Tres de las especies detectadas *Hypocrea* no forman un anamorfo *in vitro*, mientras que el anamorfo es desconocido en cuatro especies, porque nunca han sido cultivados.

A partir de lo que se conoce hoy, es decir, que la morfología es a menudo insuficiente para la identificación, sobre todo si se comparan muestras de diferentes continentes, es probable que todavía muchas especies adicionales puedan ser reconocidas en Japón. Samuels y sus colaboradores ampliaron la investigación a las colecciones de América del Norte y Australia, incluyendo también los especímenes recolectados en Europa. La introducción de los análisis filogenéticos moleculares explican la taxonomía de *Hypocrea* (Samuels *et al.*, 1998, Dodd *et al.*, 2002)

Vale la pena mencionar una tendencia a identificar y determinar especies de *Trichoderma* en un nicho ecológico especializado, por ejemplo especies endófitas en plantas terrestres (Jaklitsch, 2009). Degenkolb *et al.* (2006, 2008) introdujeron el análisis de metabolitos secundarios, como peptabois y tricotecenos para apoyar la filogenia, a partir de los genes.

4.2 Ecología

Las especies de *Trichoderma* son hongos de vida libre, comunes en el suelo y en la rizósfera de las plantas de diferentes ecosistemas. (Harman *et al.*, 2004). Se los puede encontrar en un amplio rango de ambientes, como son suelos agrícolas, praderas, bosques, salinas y en zonas de clima desérticos. *Trichoderma* prevalece

particularmente en resto de materia orgánica húmeda (Klein & Eveleigh, 1998). De caracterizan por un rápido crecimiento, que esporulan abundantemente y son resistentes a compuestos químicos nocivos. Estos hongos en general tienen requerimientos nutricionales mínimos y producen una alta variedad de metabolitos secundarios (Klein & Eveleigh, 1998). Además poseen la capacidad de utilizar como nutrientes una amplia variedad de materiales orgánicos naturales y de origen xenobiótico. Son reconocidos por producir una gran cantidad de proteínas extracelulares, destacándose por su capacidad para generar enzimas que degradan la celulosa y la quitina (Harman *et al.*, 2004). Por lo tanto son considerados descomponedores secundarios de la materia orgánica del suelo. A su vez existen cepas de *Trichoderma* que son parásitos de otros hongos, generando importantes pérdidas económicas en la producción de hongos comestibles. Contrariamente, no afectan a las plantas y actúan como inductores del crecimiento de las mismas. (Klein & Eveleigh, 1998). Los descubrimientos recientes muestran que se asocian a las plantas estableciendo colonizaciones robustas y de larga duración de las superficies radiculares, penetrando en la epidermis y unas pocas células por debajo de este nivel (Harman *et al.*, 2004).

4.3. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico

Los mecanismos de acción de *Trichoderma* como agentes de control biológico con base en la ecología microbiana, incluyen acción directa sobre el patógeno a través de la antibiosis, competencia por nutrientes o nichos, y el micoparasitismo o lisis del agente patógeno. El otro mecanismo es indirecto y opera por alteración de la fisiología de la planta aumentando su capacidad de resistencia al ataque del patógeno, lo cual se denomina protección sistémica o resistencia inducida. Asimismo, algunos antagonistas pueden promover el crecimiento de la planta, fortaleciendo sus sistemas naturales de defensa. Estos mecanismos no son excluyentes entre sí, y la importancia relativa de cada uno de ellos aún no está bien establecida, aunque parece que depende de la cepa de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones edáficas y ambientales.

4.3.1. Micoparasitismo

Se define micoparasitismo como la relación que se establece entre dos hongos, uno parásito de otros. En esta interacción solo se beneficia el hongo parásito, normalmente obteniendo nutrientes sin aportarle nada a cambio y en ocasiones,

causando su muerte. Es un proceso complejo entre especies cercanas o muy alejadas sistemáticamente.

En el caso de las *Trichoderma* spp. parasita una amplia gama de otros hongos y los acontecimientos que conducen al micoparasitismo son complejos. En primer lugar, las cepas de *Trichoderma* detectan otros hongos por quimiotropismo y crecen hacia ellos (Chet *et al.*, 1981). La detección del hospedante se debe en parte a la expresión secuencial de las enzimas que degradan la pared celular, en su mayoría quitinasas, glucanasas y proteasas. El patrón de inducción difiere de una cepa de *Trichoderma* a otra (Benitez *et al.*, 2004), pero los hongos al parecer siempre producen exoquitinas extracelulares. La difusión de esta enzima cataliza la liberación de oligómeros de la pared celular de los hongos patógenos y esto a su vez induce la expresión de endoquitinasas, que también pueden difundir y comenzar el ataque contra el hongo blanco, antes del contacto (Viterbo *et al.*, 2002). Las hifas del agente de biocontrol se enrollan sobre las del patógeno, mediado por la lectina de la pared celular, disuelven sus paredes y pueden llegar a penetrarlas físicamente. La lisis de la pared del hongo patógeno está acompañada por una batería de enzimas extracelulares, incluyendo quitinasas, celulasas, β -1,3-glucanasas y proteasas (De la Cruz *et al.*, 1992; Ulhoa, 1996, Benitez *et al.*, 2004).

Existe un gran número de enzimas que degradan la pared celular que participan en el micoparasitismos. Entre ellas se encuentran el sistema de enzimas quitinolíticas de *Trichoderma*, este comprende un gran número de enzimas y la lista de sus componentes se actualiza rápidamente a medida que se reportaron nuevas enzimas y genes (Benitez *et al.*, 2004; Lorito *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la β -1,3-glucanasa inhibe la germinación de esporas o el crecimiento de patógenos en cooperación sinérgica con las quitinasas (Benitez *et al.*, 1998; El-Katatny *et al.*, 2001) y antibióticos (Harman *et al.*, 2004). Por otra parte la acción de las proteasas producidas por el agente de control biológico se observó sobre *Botrytis cinerea* en hojas de poroto. Las proteasas inactivan las enzimas hidrolíticas producidas por el patógeno (Howell, 2003).

Como paso siguiente, en los sitios donde se fijan los apresorios (estructura de adherencias que genera *Trichoderma* para unirse al hongo), originan orificios por donde se produce la entrada directa de hifas del agente de biocontrol en el lumen del hongo patógeno. En este proceso intervienen al menos 20-30 genes conocidos, proteínas y otros metabolitos que están directamente involucrados en esta interacción.

(Harman *et al.*, 2004). El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación (Nico *et al.*, 2005).

4.3.2 Antibiosis

La antibiosis es la inhibición o destrucción de un organismo por los productos del metabolismo del otro. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* producen compuestos volátiles y no volátiles tóxicos que impiden la colonización por otros microorganismos. Por lo tanto, la antibiosis se produce durante las interacciones que implican compuestos difusibles de bajo peso moleculares o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. (Benitez *et al.*, 2004). En sentido estricto la antibiosis es el antagonismo mediado por metabolitos específicos o no específicos de origen microbiano. La combinación de enzimas hidrolíticas y antibióticos resulta en un mayor nivel de antagonismo que la obtenida por cualquiera de los mecanismos por sí sola (Howell, 2003; Monte, 2001; Benitez *et al.*, 2004). Las enzimas líticas, los compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas pueden interrumpir la síntesis de la pared celular y la elongación hifal de los hongos patógenos. Los géneros fúngicos más utilizados como agentes de biocontrol, *Trichoderma* y *Gliocladium*, suprimen la enfermedad por diversos mecanismos que incluyen la producción de antibióticos estructuralmente complejos como gliovirina, gliotoxina, viridina, trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina entre otros (Howell, 1993, 1998, Djonovic *et al.*, 2006). Sivasithamparan & Ghisalberti (1998) listaron 43 sustancias volátiles y no volátiles producidas por *Trichoderma* spp. que tienen actividad antibiótica. Los metabolitos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático.

Los peptaibols, son una clase de péptidos lineales que generalmente tienen una fuerte actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y hongos. Estos actúan de forma sinérgica con las enzimas que degradan la pared celular para inhibir el crecimiento de los hongos y provocar resistencia de la planta a los patógenos (Wiest *et al.*, 2002).

Con relación al efecto de *Trichoderma* sobre nematodos se notificó que las quitinasas y proteasas de *Trichoderma* spp. que son muy similares a las de los hongos

nematófagos poseen potencial para atacar estos invertebrados (Morton *et al.*, 2004). El proceso parasítico y el efecto de las enzimas y metabolitos de *Trichoderma* sobre nematodos pueden ocurrir en el suelo, en el interior de las raíces o sobre la superficie de éstas (Martinez *et al.*, 2013).

La capacidad de una misma cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos. Estos resultados resaltan que antibiosis es parte de la actividad antagonista de este hongo (Martinez *et al.*, 2013) revelando su importancia práctica.

4.3.3 Fungistasis

Los buenos antagonistas son por lo general capaces de superar el efecto fungistático del suelo que resulta de la presencia de metabolitos producidos por otras especies, incluyendo las plantas, para sobrevivir en condiciones competitivas muy extremas (Benitez *et al.*, 2004). Las cepas *Trichoderma* crecen rápidamente cuando se inoculan en el suelo, debido a que son naturalmente resistentes a muchos de los compuestos tóxicos, incluyendo herbicidas, fungicidas y pesticidas tales como DDT y compuestos fenólicos (Chet *et al.*, 1997).

En condiciones ambientales apropiadas, existen mecanismos fungistáticos en el suelo que impiden el desarrollo de los hongos. Varios estudios indican el origen principalmente biótico de la fungistasis (Watson & Ford, 1972; Louvet *et al.*, 1976), así como la capacidad de muchos hongos para sintetizar sustancias volátiles involucradas en este mecanismo (Hora & Baker, 1972; Camporota, 1985; Smith, 1976). Distintos autores identificaron entre esos componentes gaseosos al dióxido de carbono, etanol, acetaldehído, acetona, propanol, isobutanol e isopentanol (Buston *et al.*, 1966; Dos Santos & Dhingra, 1980; Hutchinson, 1971), los cuales en diferentes concentraciones intervienen en la regulación del mecanismo fungistático. Dentro del grupo de microorganismos que generan estos compuestos se encuentra *Trichoderma hamatum*. (Kwok *et al.*, 1987; Hoitink & Chung, 1989), cuyos metabolitos volátiles y su acción sobre el comportamiento frente a diez especies de hongos fitopatógenos, habitantes del suelo, fueron estudiados por Dal Bello *et al.* (1997). Estos autores utilizaron un dispositivo que constaba de dos matraces (Erlenmeyer de 250 ml), dos tapones perforados capaces de encajar en las bocas de ambos recipientes y un tubo de vidrio de 10-15 cm de longitud e igual diámetro que el de los orificios hechos en los tapones. En este estudio se utilizaron los siguientes hongos de suelo: *Bipolaris sorokiniana*, *B.*

cynodontis, *Drechslera tritici-repentis*, *Curvularia oryzae-sativae*, *C. lunata*, *C. brachyspora* y *Sclerotium rolfsii*, cuyo desarrollo micelial fue inhibido in vitro por los metabolitos volátiles que produjo *T. hamatum* (Dal Bello *et al.*, 1997). Al analizar las atmósferas internas del dispositivo empleado en este ensayo, se determinó una alta concentración de dióxido de carbono y muy bajas de oxígeno y etileno. Estudios sobre la influencia del dióxido de carbono en el crecimiento y esporulación de distintas especies, demostraron que existe un efecto inhibitorio a concentraciones del gas superiores al 10% (Hutchinson, 1971), nivel que fuera superado por el metabolismo de *T. hamatum*.

4.3.4 Competencia por nutrientes o nichos

Se define competencia por nutrientes o nichos al comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (oxígeno, espacio, nutrientes), siempre y cuando la utilización de éste por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. La inanición es la causa más común de muerte para los microorganismos, por lo que la competencia para limitar los nutrientes da como resultado el control biológico de los hongos fitopatógenos (Chet *et al.*, 1997). Por ejemplo, para la mayoría de los hongos filamentosos, la absorción de hierro es esencial para mantener su viabilidad (Eisendle *et al.*, 2004). Algunos agentes de control biológicos como *Trichoderma* secretan compuesto quelante de hierro. El ion hierro Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por ende no puede ser utilizado por los microorganismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de Fe^{2+} , que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo. Las especies de *Trichoderma* son altamente eficientes como sideróforos y detienen el crecimiento de otros hongos (Chet & Inbar, 1994). Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características intrínsecas del agente de control biológico, como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, pero también depende del tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, etc. La ubicuidad de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo y su capacidad de crecer en sustratos como la madera en descomposición, y otras formas de materia orgánica vegetal, es una prueba de que es un buen competidor por el espacio y por los recursos nutritivos (Howell, 2003). Además, muchas especies del género *Trichoderma* muestran una gran versatilidad metabólica que les permite crecer utilizando un amplio abanico de fuentes de nitrógeno y carbono (Grondona *et al.*, 1997). *Trichoderma* tiene una mayor capacidad para movilizar y absorber los nutrientes del suelo en comparación con otros organismos. El uso eficiente de los nutrientes disponibles se basa en la capacidad de

de este agente de control biológico, de obtener ATP a partir del metabolismo de diferentes fuentes de azúcares. Puede utilizar los derivados de polímeros del entorno fúngicos como son: celulosa, glucano y quitina entre otros, todos empleados para obtener glucosa (Chet *et al.*, 1997). Las especies de *Trichoderma*, se encuentran mejor adaptados a suelos ácidos, durante su interacción con otros organismos. Algunas cepas de *T. harzianum* pueden controlar el pH externo para asegurar que los valores sean los óptimos para sus propias enzimas secretadas (McIntyre *et al.*, 2004).

Algunas cepas de *Trichoderma*, definidas como competente de la rizosfera se consideran que actúan como completos simbioses. Ellos reciben los nutrientes de las plantas (exudados de las raíces) y un nicho protegido para colonizar, mientras que proporcionan a la planta protección, mejorado la absorción de nutrientes y resistencia al estrés (bióticos y abióticos) (Woo *et al.*, 2006). Estos hongos pueden comportarse como endofítico viviendo dentro de los tejidos vegetales, una parte de su vida sin causar aparente daño ni lesión (Lorito *et al.*, 2010).

4.3.5 Promoción del crecimiento de las plantas

Es posible que el potencial enzimático de *Trichoderma* para detener el proceso infeccioso de los patógenos sea mucho mayor, pues este controlador biológico secreta más de 70 metabolitos, entre ellos: sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas (Martinez *et al.*, 2013).

Perelló *et al.* (2008 a) demostraron que la cepa *T. harzianum* (T1) y dos productos sintéticos, Bion® (inductor de la resistencia sistémica adquirida) y Crusier® (potencial bioestimulante del efecto vigor) redujeron significativamente los síntomas de la enfermedad causada por *Drechslera tritici-repentis* en plantas de trigo. Además, aumentaron los caracteres de vigor de las plantas como la altura, biomasa aérea y radicular.

En los últimos años se ha comprobado la capacidad de ciertas cepas *Trichoderma* para estimular el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas, lo que se traduce en un incremento de la productividad (Harman *et al.*, 2004). Plantas de pepino inoculadas con la cepa de *T. harzianum* (T-203), mostraron un incremento del 75-95% en el sistema radical, y un aumento de la superficie foliar del 80% (Yedidia *et al.*, 2001). Para explicar este hecho se han sugerido varios mecanismos como son la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores o la conversión de material no utilizable de tal forma que puedan ser asimiladas por las

plantas. Además, Yedidia *et al.* (2001) observaron un aumento significativo en la concentración de Cu, P, Fe, Zn, Mn y Na en raíces inoculadas con *T. harzianum*. En los brotes de las plantas inoculadas, la concentración de Zn, Mn y P aumentó en un 25, 30 y 70%, respectivamente. Se demostró, de esta manera, que las mejoras en el nivel nutricional de la planta pueden estar directamente relacionadas con un mayor crecimiento.

Páez (online 2006) encontró que una cepa de *Trichoderma* contribuye al crecimiento de las raíces de maíz y algunos pastos, haciendo que estos cultivos sean más resistentes a la sequía. Este mismo autor observó, que aislamientos seleccionados de *Trichoderma* estimularon la germinación y la altura de plantas de poroto con una ganancia en peso de 60% aproximadamente.

Stocco *et al.* (2009) observaron un aumento del 30% en el peso seco aéreo y del 33% en el peso seco de la raíz, en plantas de trigo proveniente de semillas peleteadas con cepas de *Trichoderma* spp.. Esas mismas cepas redujeron la severidad de la MHT en las plantas inoculadas con *S. tritici*.

Con el objetivo de implantar cultivos de trigo utilizando tecnologías “más saludable” que aseguren un buen stand de plantas, controlen patógenos de las raíces y suelo y que además, generen un efecto bioestimulante, Fállico & Varaschin (2007) incorporaron microorganismos al suelo. Los microorganismos biocontroladores añadidos fueron: tres aislamientos de *Trichoderma*, tres bacterias del género *Bacillus* y un aislamiento de *Gliocladium roseum* procedente de Canadá. Se evaluaron dos formas de aplicación (sólidas y líquida) en distintas densidades de siembras del cultivo. En estos ensayos se destacaron 2 aislamientos de *Trichoderma* que mejoraron la implantación, aumentaron el número de plantas por unidad de superficie, e incrementaron el macollaje y el rendimiento, solo en cultivares de ciclo largo. El aumento del rendimiento varió entre el 8 y el 19 % superando un promedio del 10% respecto al uso de fungicida.

4.3.6 Inducción de mecanismos de resistencia en planta

Se ha comprobado que la asociación directa de *Trichoderma* con las raíces de la planta, estimula los mecanismos de defensa de la misma (Yedidia *et al.*, 1999), generando una resistencia contra un variado tipo de microorganismos fitopatógenos e incluso nematodos (Harman *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010). Esta resistencia inducida no es específica de un determinado tipo de planta y puede ser localizada o

sistémica, capacitándola para ejercer una respuesta mayor y más rápida ante el ataque de patógenos (Harman *et al.*, 2004).

Esta respuesta incluye la secreción de peroxidasas (Shoresh *et al.*, 2010), la síntesis de fitoalexinas, la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis o "PR", la biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell, 2006) o el aumento de los niveles de ácido salicílico y ácido jasmónico (Harman *et al.*, 2004).

Los sistemas de resistencia inducida en las plantas son complejos, pero se han dilucidado parcialmente en varios sistemas "modelo". Hay tres vías generalmente reconocidas de resistencia inducida en plantas (Harman *et al.*, 2004). Dos de estas vías involucran la producción directa de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). En una de las vías, la producción de proteínas PR es generalmente el resultado de un ataque por microorganismos patógenos. En la segunda vía, las proteínas PR se producen generalmente como resultado de la herida (causadas por insectos herbívoros) o necrosis (causada por patógenos de las plantas). Sin embargo, ambas vías pueden ser inducidas por otros mecanismos. Generalmente la vía inducida por patógenos se basa en el ácido salicílico, producido por la planta, como una molécula de señalización. Mientras que la vía inducida por daños, producidos por herbivoría, se basan en el ácido jasmónico, como los compuestos desencadenantes de la resistencia inducida. Estas moléculas de señalización y sus análogos, inducen respuestas similares cuando se aplican exógenamente. La vía que induce las moléculas de jasmonatos se designan como resistencia sistémica inducida. Los ácidos jasmónicos y salicílicos inducidos por estas vías se caracterizan por la producción de una cascada de proteínas PR. Estas generan una serie de compuestos antifúngicos como pueden ser quitinasas y glucanasas. También se generan enzimas oxidativas, tales como peroxidasas, oxidasas de polifenol y lipoxigenasas. Además, se pueden acumular compuestos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas (fitoalexinas) (Harman *et al.*, 2004). Estos autores se refieren a los procesos de todas las plantas que dan lugar a la acumulación directa de proteínas PR o fitoalexinas, como resistencia sistémica adquirida (SAR). El tercer tipo de resistencia inducida, ha sido explicado como el inducido por microorganismos no patógenos de la raíz, asociado generalmente a bacterias, y se lo describe por estos autores como la resistencia sistémica inducida por rizobacterias (RISR). Es similar a los sistemas de resistencia inducida por los ácidos jasmónico y salicílico, ya que resulta en la resistencia a enfermedades de las plantas. Además, una vez que se produce el ataque de los patógenos, la magnitud de la respuesta de la planta al ataque se incrementa y se

reduce la enfermedad. Por lo tanto, RISR es el resultado en una potenciación de las respuestas de defensa de las plantas en ausencia de la cascada de proteínas que es típica de los sistemas del ácido jasmónico o inducida por ácido salicílico (Harman *et al.*, 2004).

4.3.6.1 Actividad inmunológica en la planta

Actualmente se sabe que el sistema inmune de las plantas está constituido por una inmunidad innata que actúa de dos formas fundamentales: la primera está basada en un reconocimiento de PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), mediante receptores que reconocen estos patrones (PRRs, del inglés: pattern recognition receptors) y que se encuentran en la superficie de las células vegetales, y se denomina PTI (inmunidad activada por PAMP) (Ojito-Ramos & Portal, 2010) Ver Figura 8: modelo de zigzag de Jones & Dangl (2006) modificada por Lorito *et al.* (2010). Sin embargo, hay patógenos exitosos que producen efectores que inhiben la PTI, los cuales son reconocidos por las plantas mediante receptores adicionales, proteínas NB-LRR (del inglés: nucleotide- binding leucine-rich repeat), los cuales desencadenan respuestas efectoras contra estos que constituyen la segunda forma de actuación de la inmunidad innata y se denomina ETI (efectores activado de la inmunidad) (Jones & Dangl, 2006; He *et al.*, 2007; Boller & He, 2009). En la fase 1, los PAMPs son reconocidos por los PRRs, lo que resulta en la activación de la PTI, que puede detener la colonización adicional del tejido vegetal. Las plantas detectan inicialmente a los microorganismos a través de la percepción de los PAMPs mediante sus PRRs situados en la superficie celular. En la fase 2, los patógenos exitosos liberan efectores que contribuyen a la virulencia, los que pueden interferir con la PTI, y esto resulta en una ETS (efector de la susceptibilidad). Las respuestas intracelulares asociadas a la PTI desencadenan en producción de especies reactivas del oxígeno, rápidos cambios en la expresión de genes y un refuerzo de la pared celular. En la fase 3, determinados efectores son reconocidos por una de las proteínas NB-LRR, resultando en la activación de la ETI, la cual es una respuesta acelerada y amplificada de PTI, lo que conlleva a la resistencia a la enfermedad y casi siempre, a una respuesta de muerte celular programada en el sitio de la infección (Ojito-Ramos & Orelvis Portal, 2010). En la fase 4, el patógeno para evitar la ETI actúa eliminando o diversificando el gen efector reconocido, o adquiriendo determinantes antigénicos o efectores adicionales, que les permiten evadir la ETI. A su vez, en las plantas da lugar

a nuevas especificidades de resistencia, que deriva en el accionar de los ETI nuevamente.

Otro mecanismo de respuesta de las plantas en presencia de los hongos antagonistas se basa en el aumento de su inmunidad básica o en los patrones moleculares, generados por ella, asociados a los microorganismos (MAMPs). Esto lo logra, desencadenando el efector de la inmunidad (MTI), así como también, activando la reducción del efector que desencadena la susceptibilidad (ETS) y activando el aumento de la efectora inmunidad (ETI). Las cepas de *Trichoderma* son capaces de producir una respuesta más fuerte en la planta en comparación con la inmunidad de patógenos activada (MTI > PTI). Esto se logra mediante la producción de una variedad de MAMPs (Navazio *et al.*, 2007), tales como hidrofobinas (Djonovic *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2008), expansinas, (Brotman *et al.*, 2008), metabolitos secundarios, y enzimas que tienen actividad antimicrobiana directa. Otro mecanismo responsable de la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp. está relacionado con la detoxificación de toxinas excretadas por los patógenos y la desactivación de enzimas de éstos durante el proceso de infección.

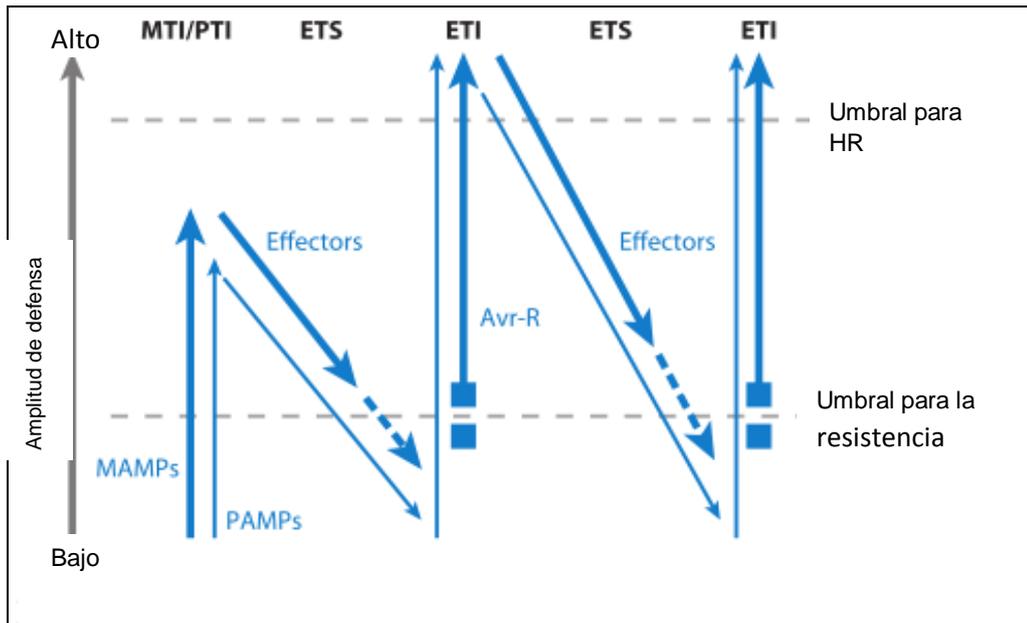


Fig. 8 Los cambios en la amplitud de defensa de la planta contra el ataque de patógenos causada por cepas de *Trichoderma* de biocontrol eficaces, como se indica mediante el modelo de zig-zag propuesto por Jones & Dangl 2006. Flechas azules gruesas indican la respuesta de la planta en presencia de *Trichoderma*.

- MAMPs:** patrones moleculares asociados a los microorganismos;
- PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos;
- MTI:** la inmunidad activado por MAMPs -;
- PTI:** la inmunidad activado PAMPs -;
- ETS:** efector activado de la susceptibilidad;
- ETI:** efector activado de la inmunidad,
- HR:** la respuesta hipersensibilidad.

Además, algunas cepas de *Trichoderma* son capaces de contrarrestar los efectos de los patógenos que interfieren con MTI, por ejemplo, mediante la inhibición de factores de patogenicidad (Elad & Kapat, 1999) o del control de la colonización de los patógenos y su nutrición. Esto reduce ETS y limita la pérdida de la resistencia, logrando el mantenimiento de la respuesta de la planta a un nivel por encima o justo por debajo del umbral para la resistencia (Figura 8). Por último, *Trichoderma* también puede mejorar los ETI, causando una respuesta más rápida (priming que es la activación de defensa de la planta antes del contacto con un patógeno) o activarla por la liberación de compuestos que, al igual que con algunas moléculas de patógenos, son reconocidos específicamente por los receptores celulares de la planta provocando mecanismos de defensa (Bailey *et al.*, 1993).

La resistencia a las enfermedades de las plantas generada por *Trichoderma*, también ha sido observado en el campo. Se ha atribuido a la participación de un muchos metabolitos bioactivos producidos por el agente de biocontrol que generan señales bioquímica en las plantas (Lorito *et al.*, 2010).

En el estudio de los mecanismos de defensa del trigo frente a *S. tritici* se ha determinado el rol de las proteasas extracelulares, en particular se han estudiado la serín proteasa presentes en el fluido intercelular de las hojas de trigo y su inhibidor. Hasta el momento se demostró que la proteasa extracelular producida en un cultivar de buen comportamiento frente al patógeno, cuadruplicó su actividad, actuando como un compuesto antifúngico (Segarra *et al.*, 2002). Esta propiedad también se demostró a través de la inhibición de la germinación de conidiosporas del patógeno (Segarra *et al.*, 2000). Otro de los compuestos descritos fue una proteína del tipo Germin like, que actuaría como inhibidor de la serin-proteasa en los cultivares susceptibles (Segarra, 2002 Tesis Doctoral). Posteriores estudios en plantas pretratadas (peleteado) con *T. harzianum* e inoculadas con *S. tritici*, demostraron que la actividad proteolítica se duplicó, regulando el crecimiento del patógeno. (Segarra *et al.*, 2005, Cordo *et al.*, 2004, 2007, Stocco *et al.*, 2009).

4.4 *Trichoderma harzianum*

Samuels (2006) ha citado a *T. harzianum* como una especie cosmopolita porque se la aisló de cultivos diferentes (cereales, hortícolas, cultivos tropicales como el cacao, etc), desde zonas geográficas distintas y como libres en el suelo o endófitas en plantas. De ahí la importancia de su masiva utilización en el control biológico.

Las Especies europeas de *Hypocrea* identificadas y agrupadas por Jaklitsch (2009) con ascosporas verdes se distribuyen entre varios clados. Estos son *Chlorospora*, *Spinulosa*, *Harzianum*, *Strictipilosa* y *Cerámica*. La especie *H. lixii* teleomorfo de *T. harzianun*, en esta clasificación es ubicado en dentro del clado *Harzianum*.

El clado *Harzianum* es filogenéticamente complejo e *H. lixii* es un agregado de especies en lugar de una especie bien definidas. Chaverri & Samuels (2002) establecieron la relación teleomorfo/anamorfo de *H. lixii* y *T. harzianum* sensu stricto. Sin embargo Druzhinina *et al.* (2010) rechazó la relación teleomorfo/anamorfo después de un análisis profundo que implicó numerosas cepas. Los anamorfos de los diferentes linajes *H. lixii* morfológicamente son difíciles de distinguir unos de otros, a partir de *T.*

harzianum. Para ello, se necesitan más aislamientos del teleomorfo '*H. lixii*' en todo el mundo.

La ubicación de las especies en clados reconocidos por Chaverri *et al.* (2003), Jaklitsch *et al.* (2008), Degenkolb *et al.* (2008) se reafirma en el trabajo de investigación de Jaklitsch (2009) Los nombres de los clado o las sección se adoptan incluyendo el nuevo clado Spinulosa que está integrado por tres nuevas especies europeas. En este trabajo también se determinó a la sección *Trichoderma* según Bisset (Jaklitsch *et al.*, 2006b), integrada por 14 especies que se encuentran en Europa, como una entidad filogenética. Después de la exclusión de *T. aureoviride* y el grupo de *T. harzianum* (a veces considerados como miembros de esta sección por Gams & Bissett, 1998), esta sección está concebida como un grupo filogenéticamente homogéneo, con la inclusión de *H. voglmayrii*. El análisis del factor de elongación (*tef1*) es necesarios para definir completamente el clado (Samuels *et al.*, 2006; Jaklitsch *et al.*, 2006b).

5. Situación actual del biocontrol de *Mycosphaerella graminicola* (teleomorfo de *Septoria tritici*) en Argentina

Stocco *et al.* (2012) destacaron la importancia de la selección previa de las cepas de *Trichoderma* en ensayos en invernáculo, para corroborar su capacidad biofungicida en posteriores experimentos a campo.

Perelló *et al.* (2006) presentaron el primer informe sobre la eficacia de *Trichoderma* spp. contra patógenos necrotróficos del trigo en condiciones de campo en Argentina. Evaluaron el efecto de seis aislamientos de *T. harzianum* y de una cepa de *T. koningii* sobre la incidencia y la severidad de la mancha amarilla del trigo (*Pyrenophora tritici-repentis*) y MHT (*M. graminicola*). Los biocontroladores fueron aplicados por recubrimiento de la semilla o asperjando sobre las hojas del trigo en las diferentes etapas de crecimiento. Tres de los aislamientos estudiados (T2 para *M. graminicola*, T7 para *P. tritici-repentis* y T5 para ambos) mostraron el mejor desempeño en el control de la manchas foliares. En macollaje, seis de los aislamientos disminuyeron la severidad de *P. tritici-repentis* y *M. graminicola* hasta en un 39 % y 12-53 %, respectivamente. En algunos casos, la aplicación de los antagonistas (T2 y T5) dio un nivel de control de las enfermedades similar a la obtenida con Tebuconazol (70 y 48 %, respectivamente). También, Perelló *et al.* (2009) ensayaron dos formas de aplicación del antagonista: la pulverización de una suspensión de esporas y la técnica

de recubrimiento de semillas (peleteado), en condiciones de campo, con cuatro cepas de *T. harzianum* y una cepa de *T. koningii*. Evaluaron la eficacia en la reducción de la incidencia y la severidad de la MHT. El antagonismo fue efectivo solamente en una etapa temprana de la enfermedad. Tanto la pulverización de la suspensión de esporas sobre las hojas como la técnica del peleteado, fueron eficientes en la disminución de la enfermedad.

Jeque *et al.* (2008), en condiciones de campo, analizando el biocontrol de *S. tritici* con *T. harzianum* como pelet o aplicado en plántula, determinaron que el antagonista redujo significativamente el desarrollo del patógeno en los primeros estadios del cultivo de trigo, mientras que en etapas más avanzadas, el control ejercido por el fungicida fue mayor.

Stocco *et al.* (2009) demostraron el efecto biocontrolador cepas de *Trichoderma spp.*, aisladas de suelos de la región triguera argentina, sobre plantas de trigo proveniente de semillas peleteadas, con el antagonista e inoculadas con *S. tritici*. Para asociar ese efecto con el mecanismo biológico desencadenado por *Trichoderma spp.*, se realizaron pruebas de la actividad antifúngica del fluido proteolítico intercelular y se determinó el peso seco de las raíces y de la parte aérea de las plantas. Hubo cepas que redujeron, el área necrosada y la superficie cubierta con picnidios. Estas ejercieron el mejor efecto biocontrolador. Posteriormente Stocco *et al.* (2009) cuantificaron una elevada actividad proteolítica sobre las mismas plantas, indicando un aumento de la resistencia sistémica inducida. Además, otras cepas de *Trichoderma spp.*, estimularon el aumento del peso seco de la raíz y de la masa foliar, logrando plantas de trigo más robustas como otro mecanismo de acción antagónica. Para proteger el medio ambiente se recomienda el uso de tratamientos con *Trichoderma sp* como biofungicida ya que con al menos dos aplicaciones (peleteado en semilla y una aplicación aérea en macollaje) no solo disminuyó la severidad hasta grano pastoso sino que también aumentó el rendimiento en kg.ha⁻¹ y disminuyó la tasa de incremento de la enfermedad (Cordo *et al.*, 2012; Stocco *et al.*, 2012).

En Centro de Investigación de Fitopatología (CIDEFI) se encuentra a disposición de la comunidad científica, el Banco Micológico de cepas de *Trichoderma spp.*. El objetivo de este banco es de disponer de un sistema de clasificación para *T. harzianun* que asigne a cada cepa con aptitud biocontroladora, una serie de caracteres que la definan y permitan seguir su evolución en el tiempo y el medio ambiente. (Stocco *et al.*, 2011).

Con esta investigación se propuso incrementar el conocimiento de las bases del biocontrol de *Mycosphaerella graminicola*, causante de la Mancha de la hoja en el cultivo de trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum*.

OBJETIVO GENERAL

Presentar un estudio integrado, que combine propiedades: morfológicas, fisiológicas y moleculares de los aislamientos nativos de *T. harzianum*, para ser utilizarlos como eficientes agentes de control biológico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar *T. harzianum* provenientes de muestras de suelo, colectadas de distintas áreas de la región triguera argentina.
- Evaluar la habilidad de los aislamientos mediante bioensayos en invernáculo para controlar la MHT.
- Caracterizar morfo-culturalmente las cepas en estudio.
- Caracterizar molecularmente la variabilidad dentro de la especie y generar grupos de similitud.
- Caracterizar fisiológicamente las cepas en base a los siguientes parámetros: a) crecimiento de las colonias en diferentes fuentes carbonadas. b) crecimiento, esporulación y pigmentación de las colonias en presencia de medios de cultivo enriquecidos con aminoácidos y sales orgánicas como fuente nitrogenada. c) crecimiento de colonias y esporulación de conidios bajo condiciones extremas de temperatura y pH.
- Estudiar la habilidad de los aislamientos para producir enzimas potencialmente involucradas en el biocontrol de fitopatógenos.
- Correlacionar el perfil genético de cada grupo de similitud con los caracteres fenotípicos planteados (morfología, reacciones fisiológicas, actividad enzimática).
- Relacionar la actividad biológica (morfología, reacciones fisiológicas, actividad enzimática) de las cepas seleccionadas por grupos de similitud con su capacidad como agente biocontrolador.

HIPÓTESIS RELEVANTES

- La integración de los atributos fisiológicos y bioquímicos junto con criterios morfológicos clásicos, sirven para establecer nuevos grupos infraespecíficos.
- Las diferencias entre los grupos infraespecíficos se correlacionan con diferentes niveles de actividad biocontroladora sobre la mancha de la hoja del trigo.
- Las características morfológicas estudiadas varían dentro de los rangos aceptados por la taxonomía clásica, aunque por sí solas no permiten la diferenciación en grupos dentro de la especie.
- Las cepas de *T. harzianum*, provenientes de diferentes áreas trigueras, se caracterizan por la heterogeneidad en sus patrones moleculares, demostrando la naturaleza genética de su variabilidad.
- Los grupos de cepas con iguales perfiles genéticos se asocian a individuos con el mismo potencial antagonista.
- Las pruebas fisiológicas realizadas con *T. harzianum* producen la máxima discriminación entre las cepas estudiadas.
- La habilidad de los aislamientos seleccionados de *T. harzianum* para producir enzimas hidrolíticas tienen estrecha relación en el éxito biocontrolador sobre la MHT. Esta capacidad está relacionada con los niveles de enzimas de endoquitinasa y β 1,3 glucanasas

CAPÍTULO I

SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp.

1. Introducción

Mycosphaerella graminicola (Fuckel) Schroeter in Cohn (anamorfo *Septoria tritici* Rob. ex Desm.) es uno de los hongos patógenos más destructivos del trigo (King *et al.*, 1983), causante de “la mancha de la hoja”, que ocurre en todas las áreas de cultivo del mundo. Se mencionan importantes pérdidas en el campo que pueden ser atribuidas a este patógeno, especialmente durante las estaciones con elevadas precipitaciones y humedad (Verreet, 1995; Schnieder *et al.*, 2001).

La “septoriosis de la hoja”, también conocida como “pardeado de las hojas” o “tizón foliar del trigo”, es una de las enfermedades endémica de la región IV, en la Argentina (Kraan & Nisi, 1993). Esta enfermedad causa pérdidas significativas en las variedades susceptibles de trigo. En la Argentina, en la década de 90’ las pérdidas de rendimiento variaron entre el 21 al 37% (Kraan & Nisi, 1993), el 20 a 50% (Anonne *et al.*, 1991) y el 16 a 45% (Simón *et al.*, 2002) según se han registrado en las diferentes campañas. En otros países, las reducciones en el rendimiento fueron de un rango del 31 al 54% (Eyal *et al.*, 1987), del 10 al 45% (Caldwell & Narvaez, 1960), e incluso se ha registrado una reducción mayor al 60% (Shipton *et al.*, 1971). Esta enfermedad ataca en todos los estados de desarrollo del trigo, sobre todo cuando las condiciones ambientales son predisponentes, causando grandes pérdidas en los rendimientos (Eyal *et al.*, 1987).

La expansión del sistema de siembra directa, pero sin rotación de cultivos (monocultivo), la difusión de genotipos susceptibles, el uso de semillas infectadas, los cambios climáticos y la poca diversidad de cultivares sembrados, probablemente contribuyeron al aumento de la ocurrencia e intensidad de enfermedades foliares en trigo. Esto llevó a estudiar nuevas estrategias o tácticas de manejo. De esta forma, surge un nuevo marco conceptual, el manejo integrado de enfermedades (Carmona, 2004).

Dependiendo de las condiciones climáticas en la etapa de macollaje, pueden ser necesarias una o más aplicaciones de fungicidas. Una combinación de estas prácticas y el control biológico es posible, como estrategias para el manejo de “la mancha de la hoja de trigo” (Annone, 2005). El uso de agentes de control biológico

complementario a la resistencia de las plantas, proporciona un nivel equivalente de control, al uso de productos químicos, con el menor impacto negativo sobre el medio ambiente (Perelló *et al.*, 2008).

Las plantas hospedan muchos microorganismos no patógenos o débilmente patógenos en forma endófito o epífita. Tales microorganismos pueden ser importantes antagonistas que se encuentran dentro, sobre tejidos vegetales y en la rizosfera del cultivo (Mónaco, 2002). Según la capacidad antagónica que posean, podrán desplazar, reducir, suprimir o inducir la resistencia al patógeno (Mónaco, 2002). Las especies de *Trichoderma*, están ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y alguno de sus representantes se destacan, por sus propiedades antagonistas (Dal Bello, 1997). Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1982). Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de cuatro tipos: competición directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil, parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre el hongo fitopatógeno e inducción de la resistencia en plantas (Grondona *et al.*, 1997; Rey *et al.*, 2000; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004; Shores *et al.*, 2010). El control biológico es el resultado de un número de diferentes mecanismos de acción del antagonista que actúan en forma sinérgica para lograr el control de enfermedades (Howell, 2003). La importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada interacción de antagonista-patógeno y de las condiciones ambientales.

Para la aplicación de un biofungicida se deben tener en cuenta aquellos aspectos, que permitan la expresión de los mecanismos de control de la cepa y que se relacionan con la interacción planta - fitopatógeno susceptible - ambiente favorable (temperatura, humedad, presencia de oxígeno, pH), condiciones del suelo (estructura, contenido de materia orgánica y nutrientes) y horario de aplicación (Martínez *et al.*, 2013). Los métodos de aplicación se basan en la pulverización foliar, los tratamientos de suelo, el recubrimiento de semillas, la protección de raíces de árboles, el tratamiento de estacas, tratamientos de heridas producidas por la poda y pulverización directa de una suspensión del hiperparásito sobre la lesión del hongo (Navi & Bandyopadhyay, 2002).

Actualmente, *T. harzianum*, sola o en combinación con otras especies de *Trichoderma*, se está utilizando en preparaciones comerciales para el control de numerosas enfermedades de plantas producidas por hongos. Estas formulaciones se aplican directamente al suelo, a las semillas (“peleteado”), mediante diferentes sistemas de riego, a plántulas para trasplante en semilleros y en cultivos definitivos (Cook, 1997; Grondona *et al.*, 2001). La inoculación de *Trichoderma* al sustrato para plantines o directamente al suelo, en campo abierto, ofrece una protección mayor a los cultivos. También puede mezclarse con abonos orgánicos y enmiendas, tal como se hace con inoculantes bacterianos usados como fertilizantes ecológicos (Martínez *et al.*, 2013).

Las cepas de *Trichoderma* son capaces además, de combatir patógenos foliares y aéreos (Martínez *et al.*, 2013). Por ejemplo, con aplicaciones aéreas de *T. harzianum*, a las dosis de 5 y 10 kg.ha⁻¹ la incidencia de *Rhizoctonia solani* en plantas de arroz disminuyó en un 30% (Rodríguez *et al.*, 1999). Otra forma de aplicación de *Trichoderma* es sobre los residuos vegetales. Garrido (2009) incorporó *T. harzianum* conjuntamente con los restos de cosecha de arroz y obtuvo una reducción de hasta 50% de los esclerocios y de 13,40% de la severidad de *R. solani* en el cultivo.

Stefanova (2007) propone el empleo de *Trichoderma* por medio de las semillas con una suspensión de esporas o en forma de polvo y un tensioactivo, ya que es la forma más económica y extensiva para introducir los agentes de control biológico en la producción y por estas razones, una de las variantes más utilizada (Martínez *et al.*, 2013). El tratamiento de las semillas para evitar las infecciones post-emergentes redujeron al menos del 50% las infecciones por *Fusarium solani* y a un 3% las de *R. solani* (Sandoval *et al.*, 1995). En otros ensayos se obtuvo una efectividad de 100% frente a *F. moniliforme* y de 88% contra *Phoma* spp. A su vez los tratamientos de semillas en pimiento, incrementaron el porcentaje de germinación y estimularon el crecimiento (Stefanova, 2007).

Varios investigadores argentinos trabajaron en la técnica de aplicación de los agentes de control biológicos. Perelló *et al.* (2009) demostraron una reducción de la severidad causada por *S. tritici*, tanto en la aplicación en forma de pulverización foliar o como un recubrimiento de la semilla. Sin embargo, Cordo *et al.* (2007) determinaron que la aplicación en forma de recubrimiento de semillas de trigo fue más eficaz, contra la MHT, que la pulverización foliar. En este estudio se probaron 14 aislamientos de *Trichoderma* spp. y se determinó que *T. harzianum* (Th5) produjo el mayor nivel de

protección. A partir de las hojas de plantas provenientes de semillas tratadas con TH5, se midió la actividad proteolítica de la serín proteasa en el apoplasto. La presencia del antagonista incrementó la acción antifúngica de la enzima de la planta contra *S. tritici*, confiriéndole resistencia a los cultivares de trigo susceptibles. Estos resultados sugieren que *T. harzianum* estimula una respuesta bioquímica sistémica inducida contra la MHT.

1.1 Los objetivos de este capítulo son:

- Aislar hongos perteneciente a *T. harzianum* provenientes de muestras de suelos, de distintas áreas de la región triguera argentina
- Evaluar la habilidad biocontroladora de los aislamientos sobre la MHT mediante ensayos en invernáculos

2. Materiales y Métodos

Durante los años 2008, 2009, 2010 y 2011 se han recolectado muestras de suelo de distintas zonas geográficas de la Región Triguera Argentina. Las muestras colectadas pertenecen a las siguientes localidades que se presentan en la Tabla 1. Se realizó un muestreo jerárquico de la rizosfera de trigo. Esta técnica de muestreo fue adaptada de la descrita por Reis, (1994). Partiendo de una muestra original de 500g se fracciono en alícuotas de 5g. Cada una de estas muestras se acondiciono (secada a temperatura ambiente, molida con un mortero y tamizada a través de un cedazo) y conservó en la heladera a 4 °C.

Regiones trigueras	Localidades	Año
II Sur	Los Hornos Bragado;	2008
III	Paraná	2009
V Sur	Bordenave	2009
IV	Lobería	2010
V Norte	Manfredi	2010
II Norte	Pergamino	2011
I	Santa Fe.	2011

Tabla 1. Origen geográfico y año de recolección de las muestras de suelo

2.1. Obtencion de aislamiento de *Trichoderma* spp.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. se realizaron a partir de las muestras de suelo conservadas a baja temperatura. Se utilizó la técnica de dilución en placas con el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* (TSM) (Elad *et al.*, 1981). Esta técnica consistió en suspender 5 g de suelo en 50 ml de agua destilada estéril (dilución 1:10). Luego de agitar durante 20 minutos se realizaron dos diluciones seriadas. Para ello se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión que se vertió en los 9 ml de agua destilada estéril, logrando una dilución 1:100. Luego, de la misma manera se realizó la dilución 1:1000. De cada una de las diluciones, se colocaron en cajas de Petri, 1 ml de la suspensión con 1 ml de la solución fungiestática con PCNB (Pentacloronitrobenceno). Posteriormente, se agregó el medio de cultivo (TSM) fundido y enfriado a 50°C. Las cajas fueron incubadas en estufas a 26°C, durante 5 días. Aquellas colonias de *Trichoderma* spp. que crecieron de manera aisladas fueron repicadas en estrias de APG.

La composición del medio TSM es la siguiente:

Nitrato de Amonio (NO_3NH_4)	1,00 g
Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)	0,90 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,20 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,15 g
Cloranfenicol	0,25 g
Rosa de bengala	0,15 g
Glucosa	3,00 g
Agar	20,00 g
Agua	1,00 L

Para preparar la solución fungiestática se agrega 0,2 g de PCNB en 1 L de agua destilada estéril. No se esteriliza ya que éste es un fungicida termolábil.

Para otras prácticas de manejo del hongo, como multiplicación de conidios, se utilizó el Agar Papa Glucosado al 2% con cloranfenicol 500 mg/L. (APG).

2.2. Técnicas de conservación de las cepas

Se realizaron ensayos de laboratorio para definir la técnica de conservación de los aislamientos de *Trichoderma* spp.. El objetivo fue asegurar la estabilidad de las propiedades morfológicas, fisiológicas y de la capacidad antagónica de los aislamientos en estudio. Se probaron distintas técnicas: 1) en vaselina líquida, 2) en agua destilada estéril 3) en glicerol, 4) en sílica gel y 5) en papel de filtro estéril. Las tres primeras se realizaron en frascos de vidrio (de 7 cm de alto por 2 cm de diámetro

y 10 ml de capacidad), en un volumen final de 5 ml, cerrandolos con tapa a rosca y esterilizados. Bloques de 1 cm. del hongo esporulado sobre APG que se quería conservar, se transfirieron a los mencionados envases (López Lastra *et al.*, 2002). Luego se mantuvieron en la heladera a 4°C.

Para la técnica con sílica gel, el material se trituró en un mortero hasta obtener un grado de molienda similar a la sal fina. Luego se la envasó en frascos de vidrio de 10 ml con tapa plástica y se la esterilizó en horno seco a 160°C, durante 6 hs (López Lastra *et al.*, 2002). Para preparar la suspensión de conidios de *Trichoderma*, se virtio agua destilada estéril sobre el cultivo, raspando la superficie con una varilla de vidrio. La suspensión resultante se filtró y se sembraron 300 µl en el granulado de sílica gel. Luego se agitó enérgicamente para lograr una buena distribución de la suspensión en las partículas mencionadas. Los frascos sembrados se mantuvieron en el freezer a -20°C.

Para la técnica de papel de filtro, se colocaron tiras estériles de este papel de 1 cm. de ancho, dentro de cajas de petri con APG donde se encontraba creciendo el hongo. Se incubó en estufa durante 7 días. Una vez que el hongo colonizó el papel de filtro, se retiró y se seco a temperatura ambiente durante 7 días. Las tiras fueron conservadas dentro de sobres de papel de strassa de 7 X 13 cm, protegidas con papel de aluminio, en el freezer a -20°C.

La evaluación del crecimiento de los aislamientos, para cada uno de los métodos de conservación, fue realizada, a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses de iniciado el experimento. Para ello, los pequeños bloque que se conservaron en cada una de las técnicas (vaselina, agua estéril y glicerol) se cultivaron en medio sólido de APG. Para el caso del papel de filtro se cortó un trozo de 1 cm de la tira con el hongo y se la cultivó sobre el mismo medio sólido. Para la técnica de sílica gel se espolvoreo sobre el medio de cultivo sólido una pequeña cantidad del polvo de sílica gel con las esporas del hongo conservadas.

2.3. Obtención de cultivos monospóricos

Para caracterizar morfológicamente los aislamientos de *Trichoderma* spp., se obtuvieron cultivos puros generados a partir de una sola espora. La técnica empleada fue una modificación de la técnica utilizada por Lecuona (1996). Un disco de micelio de diámetro uniforme, proveniente de cada aislamiento desarrollado en APG, se transfirió a 10 ml de agua destilada estéril. Se agitó en el vortex hasta lograr una suspensión

homogénea. Se realizaron varias diluciones hasta obtener una concentración de 1×10^5 de conidios/ml de la cepa. El recuento de espores se realizó con la cámara de Newbawer. Se sembraron 200 μ l de la suspensión de conidios obtenida, sobre el medio sólido agar-agua. Al término de 24h se observó la germinación de los primeros conidios bajo lupa o a contra luz. De aquellos conidios que germinaron en forma aislada, se tomó un trozo de cultivo, con una aguja esterilizada sobre llama directa. Esta se colocó en cajas de Petri individuales con medio de cultivo APG al 2%. Se descartaron aquellas que mostraron un crecimiento concéntrico doble o triple, ya que ese patrón indicó que se transfirió más de una espora.

2.4. Aislamientos y producción de inóculo de *S. tritici*

Los aislamientos de *S. tritici* se realizaron a partir de fragmentos de tejido infectado de hojas de trigo o por transferencias de esporas de un picnidio (Cordo, 1979). Seis replicas de cada aislamiento se cultivaron en APG e incubaron durante 21 días en condiciones de laboratorio (temperatura media de 20°C y luz difusa).

Para la producción de inóculo se utilizó una mezcla de dos aislamientos virulentos de *S. tritici*: uno de la localidad de 9 de Julio (FALP9J008) y el otro de la localidad de Pla (FALPLA008), ambas de la provincia de Buenos Aires. Para lograr una cuantiosa esporulación, los aislamientos se cultivaron en cajas de Petri con el medio de cultivo agar malta (30 gr/l de extracto de malta, 5 gr/l de peptona, 2 gr/l de extracto de levadura y 20 gr/l de agar en agua destilada). La suspensión de conidios se obtuvo inundando las cajas con aproximadamente 5 ml de agua destilada; luego se raspo la superficie de la colonia con un ansa estéril y, por último, la suspensión resultante se filtro con una malla tramada. La concentración de la suspensión se ajustó a 1×10^6 esporas/ml.

2.5. Actividad biocontroladora de aislamientos seleccionados de *Trichoderma* frente al agente causal de la MHT

Los ensayos biológicos se realizaron mediante inoculaciones artificiales en el invernáculo siguiendo la técnica descrita por Cordo *et al.* (2007). Se seleccionaron 30 cepas de *Trichoderma* spp. de cada una de las zonas de la región triguera argentina mencionadas en la Tabla 1. Cada una de las 30 cepas, correspondientes a una zona triguera, se aplicó sobre la semilla, peleteando con el micelio y conidios del antagonista. El peleteado de la semilla se realizó: agitándolas por 30 minutos en una suspensión preparada con 90 ml de agar agua al 2 % al que se le adicionó 10 ml de

una suspensión de conidio de *Trichoderma* spp., con 1 gota de tensioactivo (Figura 9). Una vez finalizado el peleteado, se las dejó secar a temperatura ambiente por 24h (Figura 10).



Fig.9 Peleteado de la semilla de trigo con cepas de *Trichoderma* spp.



Fig. 10 Secado de la semilla de trigo, luego del peleteado.

Las semillas peleteadas con cada cepa de *Trichoderma* spp. se sembraron en bandejas de (16 cm x 10 cm x 5 cm) en tres repeticiones por bloque. En el caso del testigo se sembraron semillas sin el peleteado del hongo. Estas bandejas se mantuvieron en invernáculo durante la duración del ensayo con un período de tiempo variable entre 35 y 43 días, dependiendo de la influencia de la temperatura. Diariamente se registraron las temperaturas máximas, mínimas y la humedad ambiental máximas y mínimas. De esta manera se controló que las condiciones ambientales fueran las adecuadas para el desarrollo de la enfermedad.



Fig. 11 Inoculación de plantas de trigo con *S. tritici*



Fig.12 Cámara húmeda luego de la inoculación con *S. tritici*

Se evaluó el potencial antagonista de las cepas ensayadas estimando la reducción del área necrosada y de la superficie cubierta con picnidios, ambas para la primera y la segunda hojas, cuando las plantas de trigo de un cultivar susceptible (Buck Guapo) se inocularon con una mezcla de las dos cepa virulenta de *S. tritici* (Figuras 11 y 12). Esto se comparó con un testigo sin antagonistas y con una única aplicación del patógeno. De esta forma se midió la capacidad de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. de restringir el progreso de la MHT, 21 días posteriores a la inoculación (Figura 13).



Fig. 13. Aparición de síntomas y signos de la MHT después de 24 días desde la inoculación

3. Resultados

3.1. Obtención de aislamientos de *Trichoderma* spp.

Se aislaron y ensayaron bajo condiciones de invernáculo, 240 aislamientos de *Trichoderma* spp., obtenidas de muestras de suelo de cada localidad, que posteriormente fueron utilizada para comprobar su actividad biocontroladora.

3.2. Técnicas de conservación de las cepas

Para determinar la técnica de conservación más eficiente, se realizaron evaluaciones a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses de iniciado el experimento. Los resultados de las evaluaciones demostraron que todas las cepas se recuperaron con un óptimo crecimiento en vaselina, glicerol, agua destilada estéril y papel de filtro (Stocco *et al.*, 2010). Sin embargo para la técnica de sílica gel los aislamientos estudiados sobrevivieron solo 18 meses.

Aislamientos	Papel de filtro	Sílica gel	Vaselina	Agua	Glicerol																				
	Tiempo en meses desde el comienzo de ensayo																								
	3	6	12	18	24	3	6	12	18	24	3	6	12	18	24	3	6	12	18	24	3	6	12	18	24
Th1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Th2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Th3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Th4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Th5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TH6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Th7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Th8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Th9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Th10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 2. Resultados de las evaluaciones de las cinco técnicas de conservación (Papel de filtro, Sílica gel, Vaselina, Agua y Glicerol) realizadas a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses desde el inicio del ensayo. (+) Presencia de desarrollo de la colonia. (-) Ausencia de desarrollo de la colonia

Para conservar las cepas durante los años de experimentación se seleccionó la técnica de papel de filtro, dado que este método es sencillo, de rápida recuperación y permite a cada cepa mantener inalterados sus rasgos fenotípicos.

3.3. Actividad biocontroladora de aislamientos seleccionados de *Trichoderma* frente al agente causal de la MHT

Los criterios de selección de los aislamientos biocontroladores que se tuvieron en cuenta fueron: la reducción de la superficie necrosada y la reducción del porcentaje de cobertura picnidial generados por el agente de control biológico. Estos valores debieron ser significativamente menores con respecto al testigo. El otro criterio tenido en cuenta fue que el aislamiento debió reducir simultáneamente los parámetros de severidad (porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial).

La capacidad biocontroladora de los aislamientos de *Trichoderma* spp. de cada una de las localidades, se evaluó tanto en la primera como en la segunda hoja de las plantas tratadas.

Todos los datos del porcentaje de necrosis y de la cobertura picnidial registrados para todos los tratamientos, se modificaron según la transformación \sqrt{x} y luego se analizaron por ANOVA, comparando sus medias con el test de Fisher para un nivel de significancia del 5% ($P < 0,05$). Sólo se presentan los resultados de la reducción de la severidad de aquellas hojas que mostraron diferencias significativas en el análisis estadístico.

Para la localidad de Los Hornos los aislamientos de *Trichoderma* spp. 2, 4, 5 y 8 presentaron mejor comportamiento en la primera hoja del cultivar Buck Guapo por reducir significativa la superficie necrosada. Observando la Figura 14, el aislamiento 4 es el que presentó una reducción de casi un 50 % de la superficie necrosada con respecto al testigo. Además, los aislamientos: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 18, 24, 26 y 29 redujeron significativamente el porcentaje de cobertura picnidial de la misma hoja. En la Figura 14 se observa que el aislamiento 2 fue el que redujo en dos tercios la superficie cubierta por picnidios. Analizando los datos anteriores por el criterio de selección, se destacaron los aislamientos 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12 y 26.

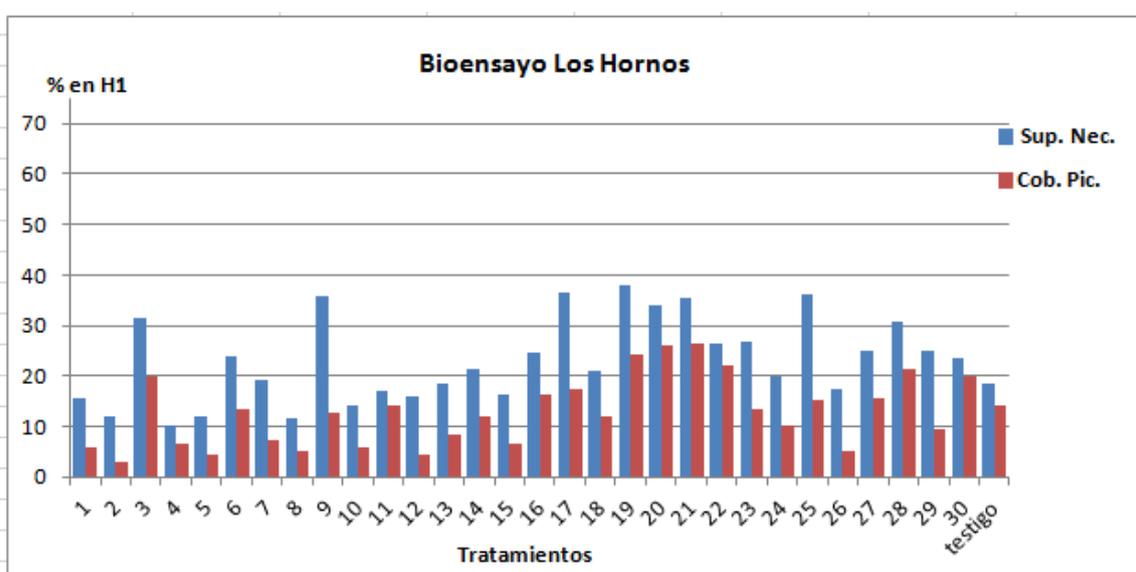


Fig. 14 Efecto de las cepas de *Trichoderma* spp sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 1ª hoja de aislamientos de Los Hornos.

Para las muestras de suelo de la localidad de Bragado se mencionan los aislamientos: 33, 34, 35, 36, 42, 46, 50, 54, 56, 57 y 58 por reducir significativamente la superficie necrosada en la segunda hoja. En la Figura 15, el aislamiento 33 redujo en un 50% dicha superficie, con respecto al testigo. También se seleccionaron los aislamientos: 33, 34, 41, 50, 51, 54, 55, 56, 59 y 60 por reducir significativamente la cobertura picnidial de la misma hoja (Figura 15). Por último se destacaron los

aislamientos 33, 34 y 54 por presentar una reducción del 50% en ambos parámetro de severidad.

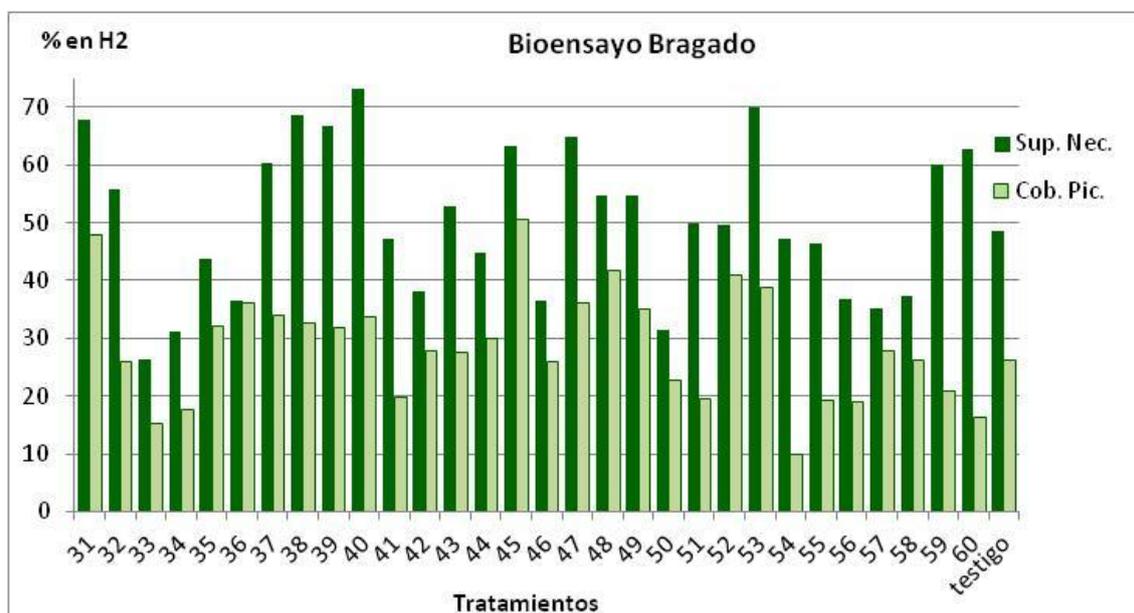


Fig.15. Efectos de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 2ª hoja de aislamientos de Bragado.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. 73, 77, 80, 83 y 90 provenientes de muestras de suelo de la localidad de Bordenave se destacaron por reducir simultáneamente los parámetros de severidad, de las dos primeras hojas infectadas por patógeno. Así el porcentaje de necrosis de la primera hoja del cultivar Buck Guapo, se redujo significativamente con los aislamientos: 62, 68, 73, 79, 80, 83, 87 y 89 (Figura 16 a), con el aislamiento 83 que generó una reducción del 25% de la superficie necrosada con respecto al testigo. Con respecto al porcentaje de cobertura picnidial en la misma hoja, los aislamientos: 61, 62, 63, 64, 66, 69, 81, 83, 84, 87, 88, 89 y 90 redujeron significativamente este parámetro en comparación con el testigo (Figura 16 a). Así mismo el aislamiento 90 generó una reducción del 95% de la superficie cubierta con picnidios, con respecto al testigo.

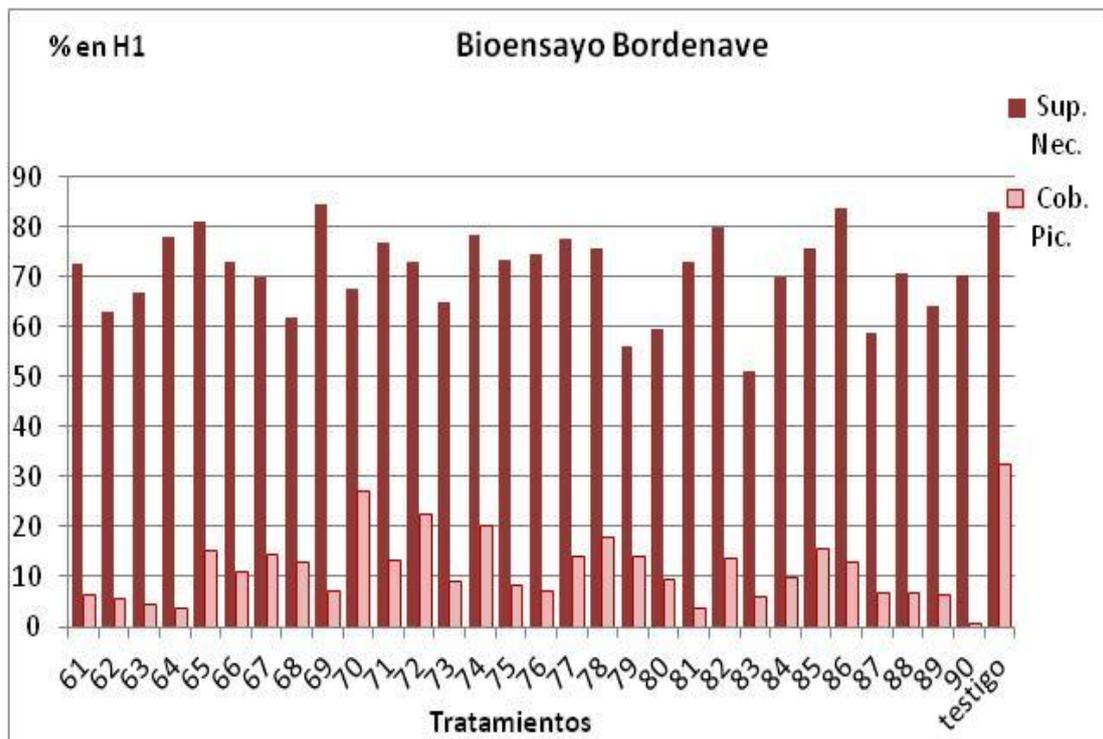


Fig. 16a. Efecto de las cepas de *Trichodema* sp. sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 1ª hoja de aislamientos de Bordenave.

Analizando la segunda hoja del cultivar Buck Guapo los aislamientos: 67, 69, 72, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 83, 87 y 90 se destacaron por reducir significativamente la superficie necrosada. Los aislamientos 73 y 80 generaron una reducción de la superficie necrosada mayor al 50 % con respecto al testigo. Con respecto a la reducción de la superficie cubierta por picnidios se mencionaron los aislamientos: 69, 73, 77, 80, 83 y 90, dentro de los cuales los aislamientos 73, 80 y 90 redujeron más de dos tercios la superficie cubierta por picnidio con respecto al testigo.

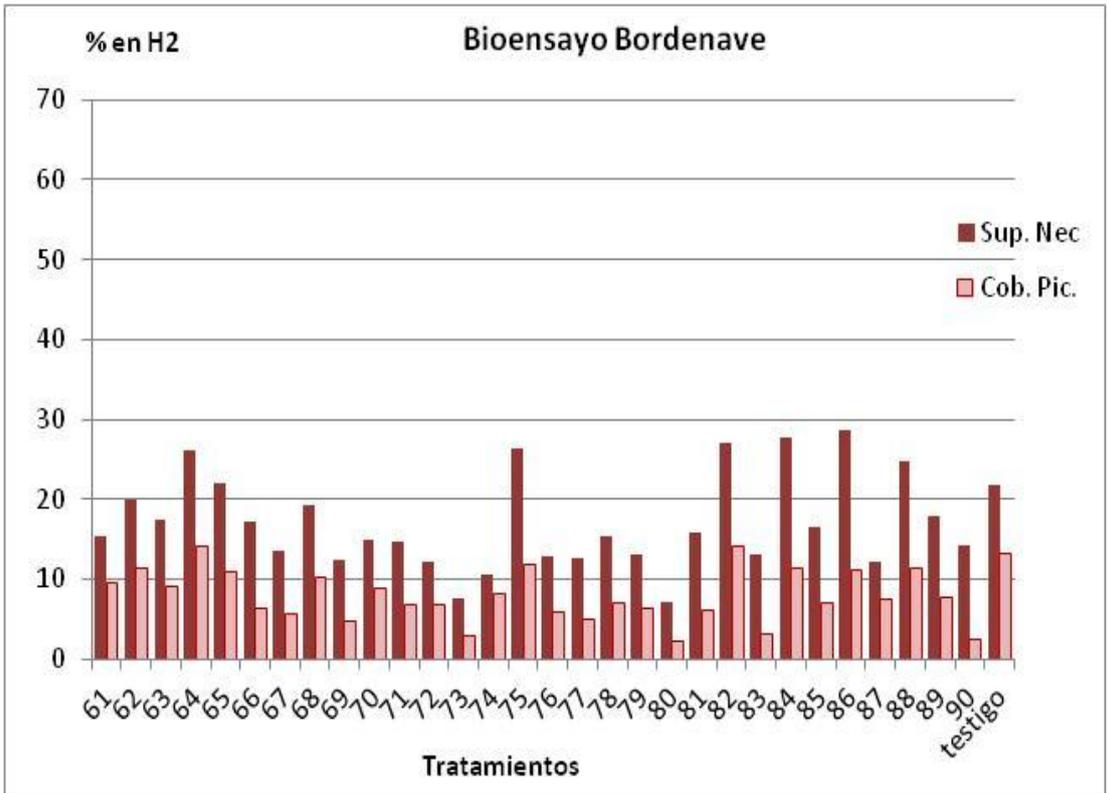


Fig. 16b. Efecto de las cepas de *Trichoderma* sp. sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 2ª hoja de aislamientos de Bordenave.

Para la localidad de Paraná (Subregión III) también se tuvieron en cuenta los resultados de las dos primeras hojas del cultivar estudiado. Con respecto a la severidad de la MHT para la hoja 1, los aislamientos de *Trichoderma* spp.: 92, 93, 95, 107, 108, 113 y 114 se destacaron por reducir significativamente la superficie necrosada en comparación con el testigo. La Figura 17a, señala al aislamiento 93 por reducir este parámetro, en más de un 50 %. Con respecto a la reducción de la cobertura picnidial de la misma hoja, la Figura 17a muestra que los aislamientos: 92, 93, 97, 107, 108, 109 y 114 son los más destacados, con los aislamientos 92, 107 y 114 como los de mayor efecto biocontrolador por reducir en más del 50% la superficie cubierta por picnidios.

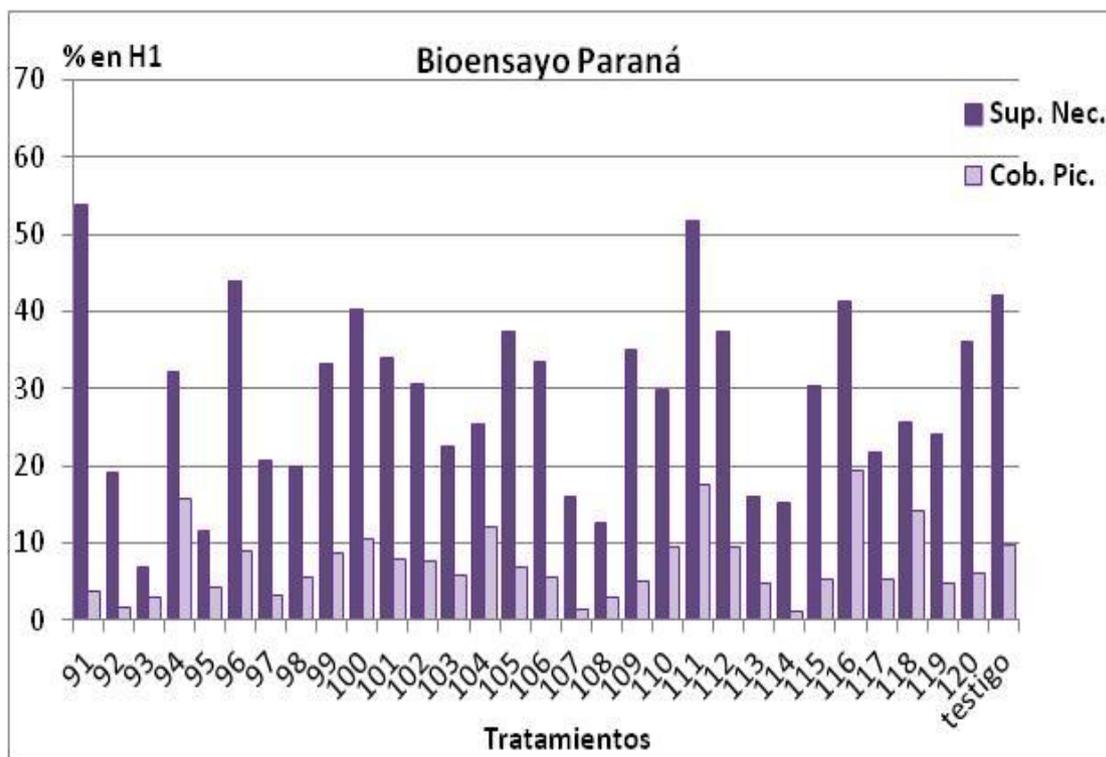


Fig. 17a. Efecto de las cepas de *Trichoderma* sp. sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 1ª hoja de aislamientos de Paraná.

Para la segunda hoja, en relación a la reducción de la superficie necrosada, los aislamientos de *Trichoderma* spp.: 92, 93, 95, 103, 107, 108, 113, 114, 117 y 119 produjeron reducciones significativas (Figura 17b). Para la misma hoja y en relación a la cobertura picnidial, los aislamientos 92, 93, 107, 108, 113 y 114 indujeron una reducción significativa de este parámetro, tal como lo muestra la Figura 17b. Se destacó al aislamiento 114 como el que redujo en más del 50 % la superficie necrosada y en un 80% la cobertura picnidial con respecto al testigo.

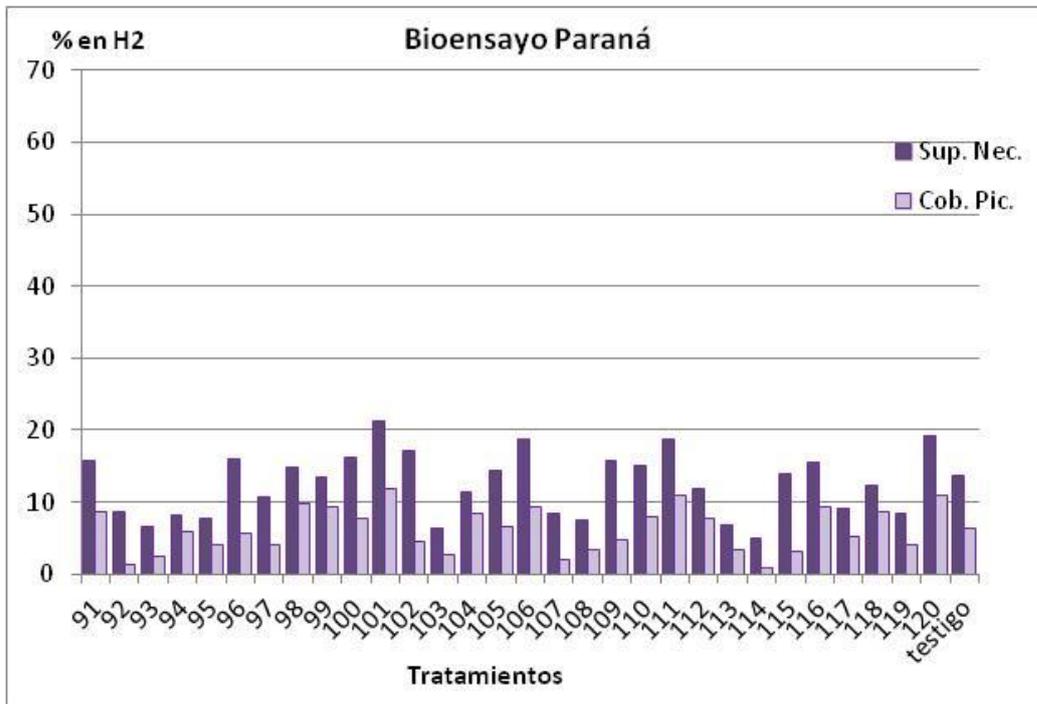


Fig. 17b. Efecto de las cepas de *Trichoderma* sp. sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 2º hoja de aislamientos de Paraná.

Resumiendo los resultados obtenidos en la primera y segunda hojas, los aislamientos de *Trichoderma* spp. 92, 93, 107, 108 y 114, de la localidad de Paraná, se destacaron como los mejores agentes de biocontrol.

De las muestras de suelo proveniente de la localidad de Manfredi, los aislamientos de *Trichoderma* spp. que generaron menor superficie necrosada en la segunda hoja fueron: 123, 129, 131, 140 y 141. Analizando la cobertura picnidial en la misma hoja, los aislamientos: 123, 129, 131, 140 y 141 generaron los valores más bajos para éste parámetro (Figura 18). La Figura 18, muestra al aislamiento 123 por reducir en un 90% la superficie necrosada y en 91% la superficie cubierta por picnidios.

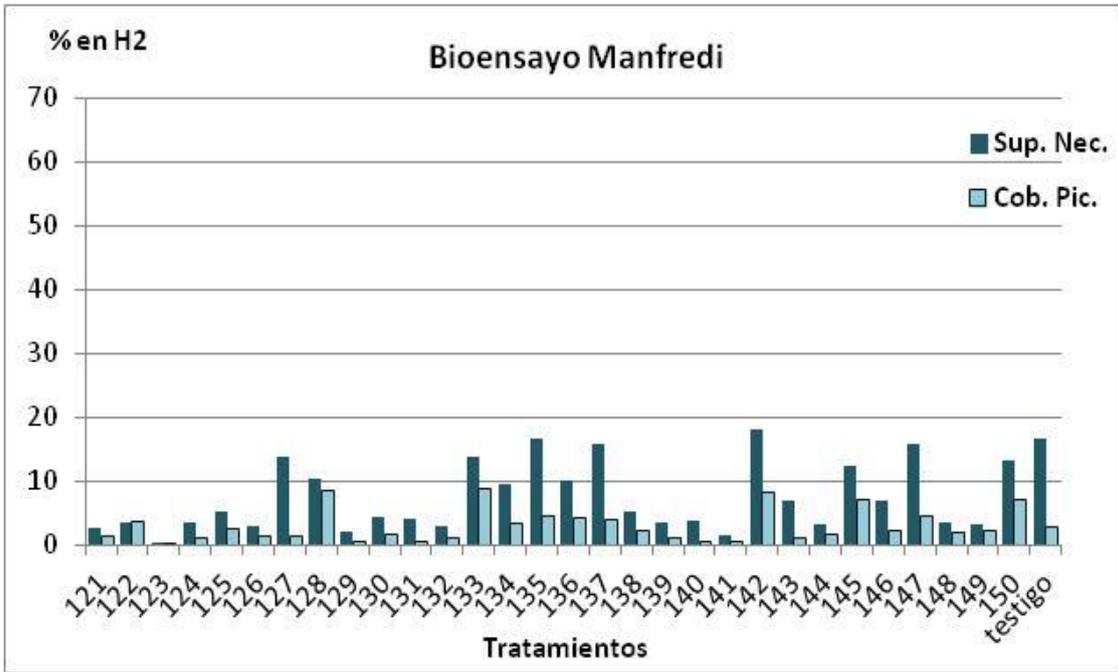


Fig. 18. Efecto de las cepas de *Trichoderma* sp. sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 2ª hoja de aislamientos de Manfredi.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. 160, 162, 165, 168, 170, 172 y 177 fueron los mejores de la localidad de Lobería. Redujeron significativamente la superficie necrosada de la primera hoja (Figura 19). El aislamiento 160 se destacó por disminuir en un 90 % dicha superficie. Por otra parte los aislamientos: 160, 162, 165, 168, 170, 172 y 177 redujeron significativamente la superficie cubierta por picnidios en la mencionada hoja. El aislamiento 170 fue el de mayor efecto biocontrolador por restringir en un 95% este parámetro de severidad.

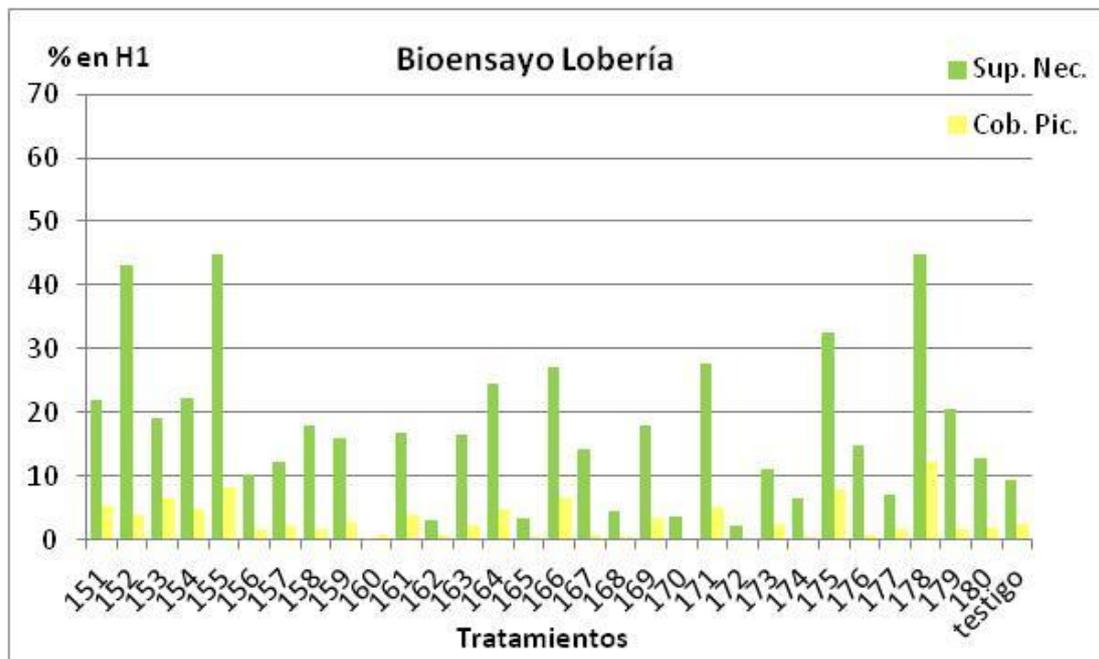


Fig. 19 Efectos de la cepas de *Trichodema* sp. sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 1^o hoja de aislamientos de Lobería.

Los aislamientos 181, 182, 183, 206 y 210 obtenidos de muestras de suelo de la localidad de Pergamino presentaron mejor comportamiento como agente biocontrolador sobre la segunda hoja por reducir simultáneamente la superficie necrosada y la cubierta por picnidios. En la Figura 20, se destaca al aislamiento 206 por generar una reducción del 50% de la superficie necrosada y los aislamientos 181 y 182 por reducir en un 80% la superficie cubierta por picnidios

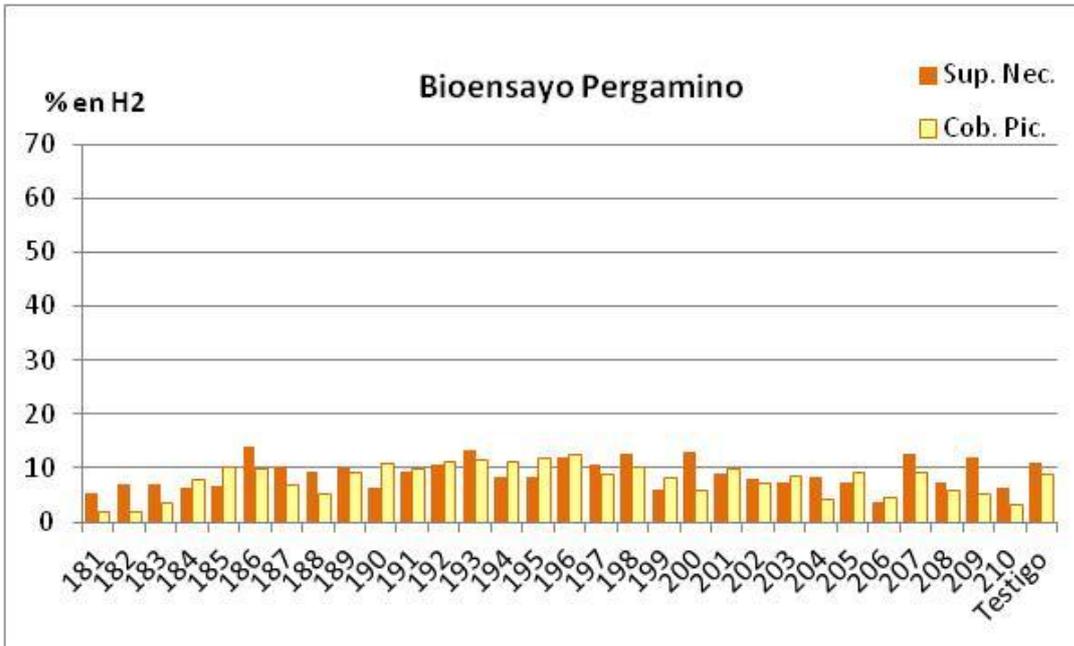


Fig. 20. Efecto de las cepas de *Trichoderma* sp. sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 2ª hoja de aislamientos de Pergamino

Con respecto a la localidad de Santa Fe, los aislamientos de *Trichoderma* spp. 211, 215, 217, 218 219, 220, 221, 229 y 236 redujeron significativamente la superficie necrosada de la primera hoja, como se observa en la Figura 21. El aislamiento 229 restringió en más del 70 % dicha superficie. En relación a la superficie cubierta por picnidios, para la misma hoja, se determinó que los aislamientos: 211, 215, 217, 218, 219, 220, 221, 229 y 236 generaron mayor reducción de este parámetro (Figura 21). Esta Figura señala al aislamiento 229 como la de mejor efecto biocontrolador, ya que redujo este parámetro en un 80%.

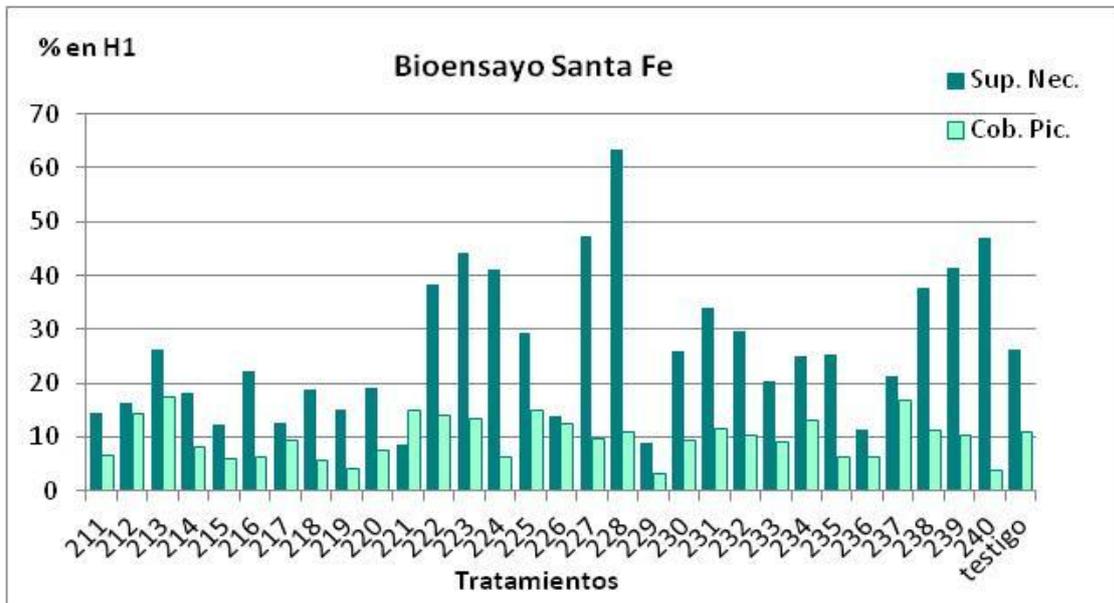


Fig. 21. Efecto de las cepas de *Trichoderma* sp sobre el porcentaje de necrosis y de cobertura picnidial de la MHT en la 1ª hoja de aislamientos de Santa Fe

Finalizando para la localidad de Santa Fe, se seleccionaron las cepas 211, 215, 217, 218, 219, 220, 229 y 236 por reducir ambos parámetros de severidad, demostrando una buena capacidad antagonista.

3.4. Capacidad biocontroladora de los mejores aislamientos de *Trichoderma* spp.

A partir de los resultados de los bioensayos para cada una de las localidades, se eligieron los aislamientos con mejor aptitud biocontroladora según los criterios de selección. Estos forman parte del Banco Micológico de *Trichoderma* spp. que está a disposición en las instalaciones del CIDEFI (Centro de Investigaciones de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata, UNLP).

Ochenta y cuatro son los aislamientos con actividad biocontroladora comprobada, que integran el Banco. En la Tabla 3 se muestran los mismos y la localidad a la que pertenecen.

Localidad	Nº de identificación de los aislamientos
Los Hornos	1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12,13, 14, 15, 18, 24, 26, 29
Bragado	33, 34, 42, 46, 50, 54, 56, 57, 58, 59, 60
Bordenave	62, 63, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 83, 87, 89, 90
Paraná	92, 93, 95, 97, 98, 102, 103, 107, 108, 113,114, 115, 117, 119
Manfredi	123, 129, 131, 140,141
Lobería	160, 162, 165, 170, 172, 177
Pergamino	181, 182,183, 206, 210
Santa Fe	211, 215, 217, 218, 219, 220, 229, 236

Tabla 3. Origen geográfico de los aislamientos con actividad biocontroladora comprobada.

En las Figuras 22 y 23 se graficaron la reducción de los parámetros de severidad de la enfermedad, en porcentaje, producido por los mejores aislamientos. Estos valores surgen de comparar los porcentajes de la necrosis y de la cobertura picnidial obtenidos por cada aislamiento, con los valores de plantas testigos que no fueron tratadas con *Trichoderma* pero sí inoculadas con el patógeno.

En la Figura 22 se observa que para la reducción de la necrosis en hoja, los aislamientos 123 y 160 restringieron la enfermedad en más de un 90 % (comparadas con el testigo =100% de enfermedad). Los siguientes aislamientos: 73, 80, 93, 107, 108, 114, 123, 129, 131, 140, 141, 160, 162, 165, 170, 172, 206 y 215 presentaron una reducción mayor del 50 % comparado con el testigo.

En la Figura 23 y teniendo en cuenta la reducción de la cobertura picnidial se dedujo que la reducción de la enfermedad es más uniforme entre todos los aislamientos. Los valores de reducción de la enfermedad variaron entre un 45% y un 80%. Los aislamientos más destacados fueron el 123 y el 170 por reducir más del 90%, este parámetro.

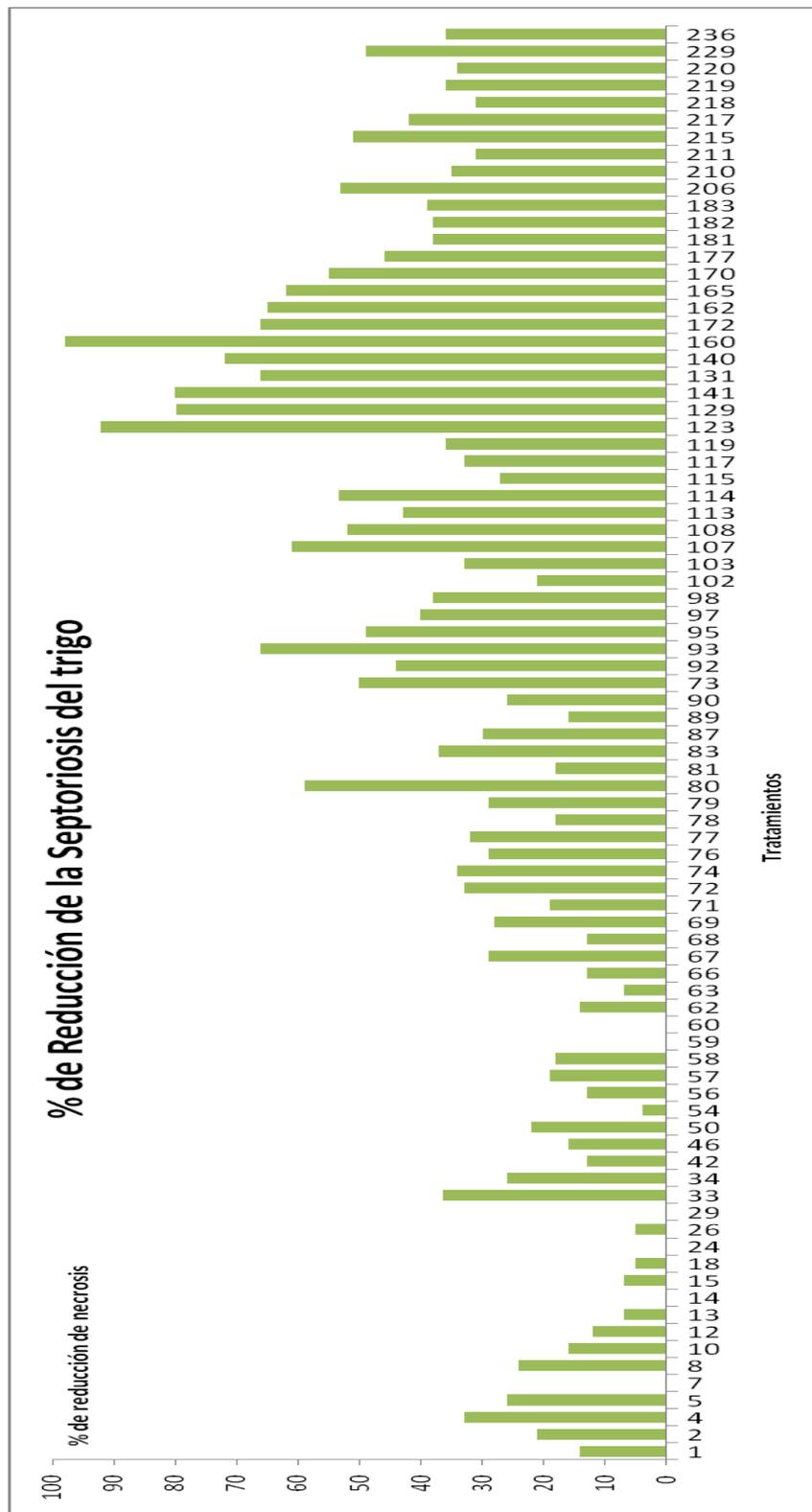


Fig. 22 Porcentaje de reducción de la necrosis producido por los aislamientos de mejor comportamiento biocontrolador. Obtenido de comparar % de necrosis del tratamiento con el % de testigo inoculado con *S. tritici*.

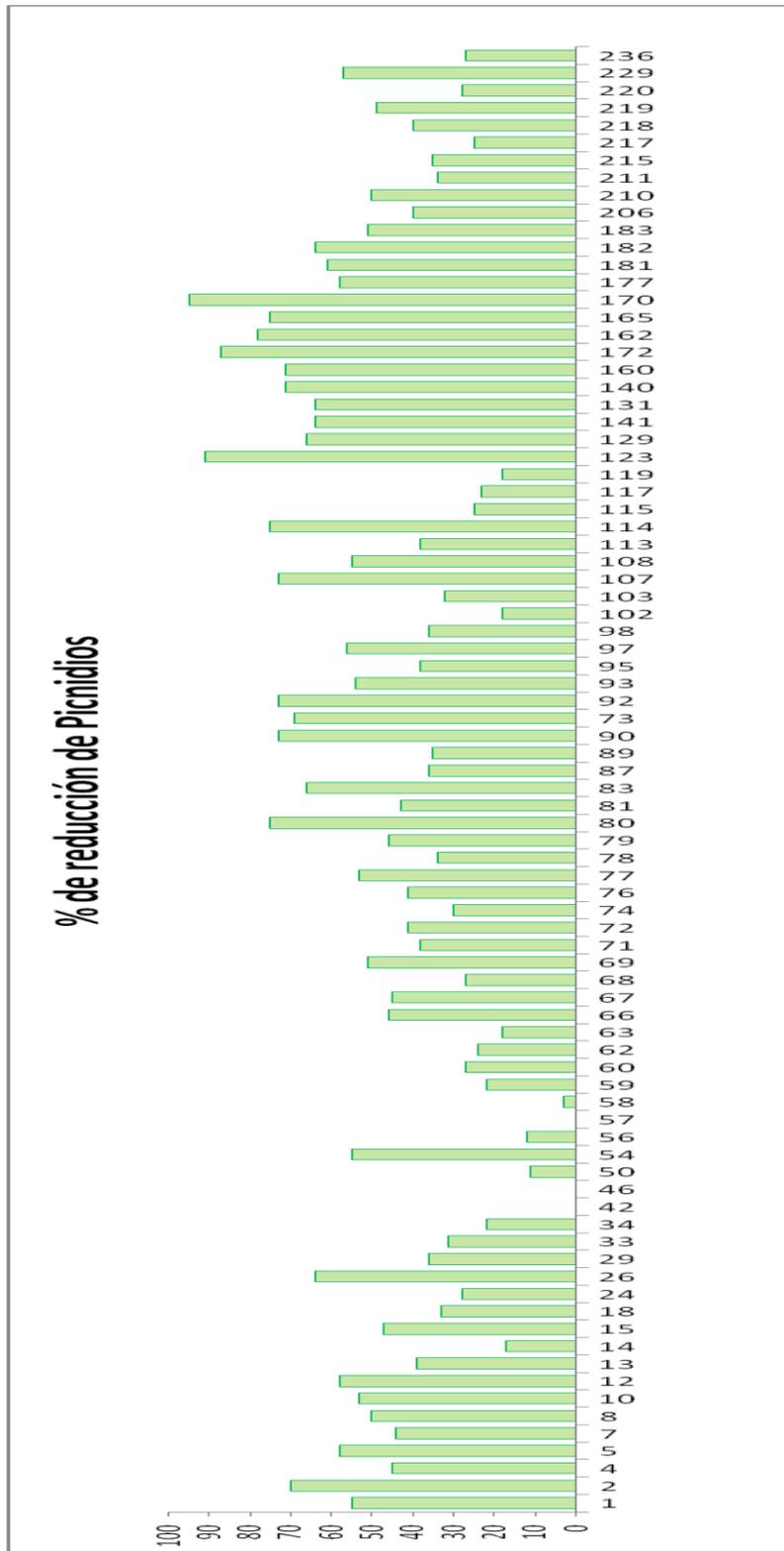


Fig. 23 Porcentaje de reducción de la cobertura picnidial producido por los aislamientos de mejor comportamiento biocontrolador. Obtenido de comparar % de cobertura Picnidial del tratamiento con el % de testigo inoculado con *S.tritici*.

4. Discusión

Tal como se mencionó en la Introducción general, para conservar las cepas de *Trichoderma* spp en el mencionado Banco Micológico, es importante contar una técnica que mantenga los rasgos fenotípicos y la capacidad biocontroladora inalterados. Según nuestro estudio, tal como lo demostrara Stocco *et al.* (2010), la técnica de papel de filtro mantuvo viable los aislamientos de *T. harzianun* durante 17 meses sin alterar su morfología, al compararlos con las técnicas de conservación con agua destilada, glicerol y silica gel. Sin embargo, López Lastra *et al.* (2002), recomendaron la técnicas de preservación con agua desionizada, glicerol y conservado a -80°C como los métodos más simples y menos costosos que mantenían con vida a los hongos. El éxito de la conservación en papel de filtro está determinado por la capacidad de *Trichoderma* de producir enzimas celulolíticas que le permite colonizar rápidamente dicho sustrato. Además este hongo genera clamidosporas, que superan las condiciones adversas. Por otra parte, esta técnica de conservación fue utilizada con éxito para mantener cultivos de *Magnaporthe grisea*, agente causal del “quemado del arroz” o “tizón del arroz”, durante el estudio de poblaciones en Argentina (Consolo *et al.*, 2005). Latterell (1985) logró a través de la técnica de papel de filtro, mantener la estabilidad de las razas de *Pyricularia* durante su almacenamiento a largo plazo. Los mismos resultados los obtuvieron Leung *et al.* (1988) sobre cultivos almacenados de *M. grisea*, obtenidas a partir de ascosporas. Asimismo, la técnica del papel de filtro posee las ventajas de ser rápida, sencilla y ocupar menos espacio durante el periodo de almacenaje.

A nivel nacional o internacional no existen antecedentes similares sobre el comportamiento de poblaciones de *Trichoderma* en ensayos conducidos en plántulas de trigo para evaluar actividad biocontroladora. En este estudio, se ensayaron 240 cepas de *Trichoderma* obtenidas de muestras de suelo de diferentes localidades de la región triguera argentina. La vasta extensión de esta región integra una gran amplitud de regímenes térmicos, hídrico y una gran diversidad de suelos. Dal Bello *et al.* (2011), para lograr la supresión de *Botrytis cinérea in vitro*, ensayaron 300 cepas de diferentes especies de antagonistas, obtenidas a partir de hojas, frutos y flores de plantas de la familia Solanaceas. Ambos estudios destacan la importancia de utilizar antagonistas microbianos nativos, para el control de hongos a campo o en invernáculo. Sutton (1995), al igual que otros autores como Mónaco (2002), Dal Bello (1997), señalaron la importancia de la adaptación ecológica de los microorganismos utilizados como antagonistas en los cultivos. Consolo *et al.* (2012) estudiaron 33 cepas de *Trichoderma*

spp. aisladas de suelo de diferentes agroecosistemas (Cultivos de soja, arroz y maíz) de Buenos Aires, sin embargo, solo analizaron el comportamiento *in vitro* de las cepas sobre diferentes patógenos. Cordo *et al.* (2007) determinaron que la técnica de aplicación de los antagonistas más eficiente para controlar a *S. tritici* es el peleteado de la semilla. Al igual que en este estudio, la capacidad antagónica fue realizada en bioensayos en plántulas, sin embargo los aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron obtenidos de diferentes cultivos (alfalfa, clavel y trigo) o seleccionados por sus antecedentes como hiperparásitos de *Sclerotium rolfsii*.

Se ha demostrado que *Trichoderma* tienen la capacidad de inducir la resistencia frente a una amplia gama de enfermedades, causadas por diversas clases de patógenos (hongos, bacterias y virus). La resistencia sistémica queda demostrada porque el control de la enfermedad se produce en un sitio que está lejos de la ubicación del antagonista (Harman *et al.*, 2004). En este principio se basa el uso de semillas de trigo cubiertas con los organismos antagonistas, como la técnica adoptada en nuestros ensayos (Cordo *et al.*, 2007; Perelló *et al.*, 2009; Perelló & Dal Bello, 2011; Stocco *et al.*, 2009; 2011, 2012). *Trichoderma* spp. se asocia a las plantas estableciendo colonizaciones robustas y de larga duración en las superficies radiculares, penetrando en la epidermis y hasta unas pocas células por debajo de este nivel, por lo tanto son considerados simbiositos avirulentos de plantas (Harman *et al.*, 2004).

La primera publicación del mecanismo de resistencia inducida fue por Bigirimana *et al.* en 1997. Estos autores demostraron que el tratamiento del suelo, con cepa de *T. harzianum* (T-39) en el cultivo de porotos, le suministró resistencia a las enfermedades que son causadas por los agentes patógenos aéreos como *B. cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum*, a pesar de que T-39 estaba sólo presente en las raíces y no en el follaje. Existen evidencias de resistencia sistémica inducida por diferentes cepas de *Trichoderma* en distintos cultivos. En cultivos industriales como el algodón, con la aplicación *T. virens* (cepas G-6, G-6-5 y G11) se redujo un 78% la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* (Howell *et al.*, 2000). En cultivos hortícolas, se ha utilizado con buenos resultados, cepas de *T. harzianum* (T-39 y T-22) en plantas de porotos frente a *Colletotrichum lindemuthianum*, *Botrytis cinerea* y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (Bigirimana *et al.*, 1997; Lorito datos no publicados); en plantas de pepino tratadas con las cepas *T. asperellum* (T-203), *T. harzianum* (T-22) y *Trichoderma* GT3-2 se redujeron las enfermedades generadas por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Yedidia *et al.*, 2003), el Green motle mosaica

virus (CGMMV) (Lo *et al.*, 2000) y *P. syringae* pv. *lachrymans* y *C. orbiculare* (Koike *et al.*, 2001) respectivamente. En cereales como el maíz se ha observado que la cepa de *T. harzianum* (T-22) redujo en un 44% la enfermedad generada por *Colletotrichum graminicola* (Harman *et al.*, 2004a). En estudios recientes en el cultivo de trigo, Stocco *et al.* (2009) observaron que cepas de *Trichoderma* 2 y 8 aisladas de Los Hornos (incluidas en los ensayos experimentales de esta Tesis) disminuían la superficie cubierta con picnidios entre 78% y 65% respectivamente. Además, estas cepas presentaron una alta actividad proteolítica, que vario entre 150 y 80 % respectivamente. Esto se relaciona con un aumento en la resistencia sistémica inducida en la planta. Resultados similares se obtuvieron con las cepas aisladas de Lobería (160) y Manfredi (129 y 141) consideradas también en este estudio. Estas cepas redujeron en un 98%, 70% y 71 % respectivamente la superficie necrosada, además de disminuir en un 70 %, 65% y 62 % la superficie cubierta por picnidios. Se realizaron experimentos bioquímicos para confirmar el efecto de la RSI en las plantas tratadas con las cepas antes mencionadas. Tal como lo describiera Segarra *et al.* (2002), fue evidente un aumento de la actividad proteolítica en estas plantas aunque con niveles variables según la cepa utilizada (datos no publicados). Además la actividad proteolítica se vio sostenida en aquellas plantas tratadas, que fueron inoculadas con *S. tritici*. La serín proteasa, generada por la planta como mecanismo de defensa, se considera uno de los tantos metabolitos inducidos por el agente de control biológico, como señales bioquímicas (Lorito *et al.*, 2010). Mansilla (2012), demostró que a pesar de que IPG (Inhibidor de proteasas tipo germina) es una proteína minoritaria en los estadios avanzados de desarrollo del trigo, continúa regulando la actividad proteolítica asociada con la resistencia a la MHT generado por *T. harzianum*, sugiriendo un aporte importante para el control biológico de *S. tritici* a campo.

La importancia de reducir la cobertura picnidial por la mayoría de las cepas de *Trichoderma* se fundamenta en que también se reducen los niveles de inóculo disponibles para una nueva infección. Las epífitias se generan cuando grandes cantidades de inóculo de organismos patógenos de crecimiento vigoroso y reproducción rápida se ponen en contacto con huéspedes muy sensibles (Stubbs *et al.*, 1986). En relación a la MHT, los conidios contenidos en los picnidios de *S. tritici* desde las hojas basales del cultivo, ascienden hacia la parte superior del canopeo por acción de la salpicadura de la gota de lluvia (Lovell *et al.*, 1997). Generar una menor cantidad de conidios para ser dispersados hará mas lenta la progresión de la enfermedad. Resultados recientes con cepas de *Trichoderma* spp. han confirmado

esta afirmación a través de las mediciones ABCDPE (Cordo *et al.*, 2012). Por ello ejercer una acción sobre el nivel de inóculo disponible tiene una implicancia epidemiológica.

Los resultados presentados hasta el momento evidencian la importancia de RSI actuando en la defensa de la planta contra *S. tritici*. No obstante numerosos autores (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Lorito 2010; Martínez *et al.*, 2013) estudiaron diversos mecanismos de acción biológico que actúan en forma sinérgica para lograr el control de enfermedades.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS DE *Trichoderma harzianum*

1. Introducción

Las especies del género *Trichoderma* comprenden un gran número de cepas fúngicas de importancia económica, principalmente como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos (Harman *et al.*, 2004; Howell, 2003). Existen cepas como las de *Hypocrea jecorina* teleomorfo de *Trichoderma reesei*, que son reconocidas por producir enzimas con fines industriales. El genoma de esta especie ha sido secuenciado totalmente, por su rol en la producción de enzimas para la industria, a principios de 2005 (<http://gsphere.lanl.gov/trire1/trire1.home.html>) (Druzhinina *et al.*, 2006). Otras especies de *Trichoderma* son reconocidas por producir metabolitos secundarios con actividad antibiótica, como por ejemplo la gliotoxina, viridina (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998). Otra especie, como *Trichoderma longibrachiatum* se conoce como un patógeno oportunista de los mamíferos inmunodeprimidos, incluyendo los seres humanos (Klein & Eveleigh, 1998; Druzhinina *et al.*, 2006). Por sus diferentes roles dentro del ecosistema, es muy deseable la correcta identificación, a nivel de especie, de cada cepa de *Trichoderma*.

Desde hace muchos años, se vienen discutiendo los diferentes caracteres morfológicos que son utilizados para caracterizar y diferenciar las especies de *Trichoderma* (Rifai, 1969; Bissett, 1991, 1992; Samuels, 2006). Diversos autores han hecho hincapié en las dificultades inherentes a la definición de las especies morfológicas de este género. Caracteres útiles para la identificación de otros géneros, con frecuencia no son tan útiles en la diferenciación de las especies de este género. Por lo general se debe al estrecho rango de variación de la morfología en *Trichoderma*, o porque los términos descriptores para determinar, por ejemplo, el color o su patrón de variaciones no son lo suficientemente precisos para definir las diferencias entre especies (Gams & Bissett, 1998). Las identificaciones existentes basadas en caracteres morfológicos siguen siendo el método principal para las determinaciones y la verificación de las especies de este género (Gams & Bissett, 1998).

Sin embargo, especies comúnmente reportadas han sido evaluadas utilizando técnicas moleculares filogenéticas y el análisis de la secuencia de ADN ha revelado la existencia de especies morfológicamente similares dentro de las especies

filogenéticas. Rifai (1969), en su clasificación reconoció que lo que él definía como una especie, a menudo era una amalgama de dos o más especies biológicas.

Para el caso de *T harzianum*, se estudiaron una amplia diversidad morfológica y geográfica de los aislamientos utilizando cuatro genes y llegaron a la conclusión que esta especie común, cosmopolita, es un complejo de especies con distintos linajes filogenéticos, geográficamente definidas que carecían de caracteres morfológicos diagnósticos (Grondona *et al.*, 1997; Hermosa *et al.*, 2001; Chaverri *et al.*, 2003).

Por lo tanto *Trichoderma harzianum* Rifai. es una especie agregada con un abanico de cepas que pueden ser usadas como agentes de control biológico de hongos patógenos de plantas. Samuels (2006) ha citado a *T. harzianum* como una especie cosmopolita porque se la aisló de cultivos diferentes (cereales, hortícolas, cultivos tropicales como el cacao, entre otros), en zonas geográficas distintas y como habitante libre del suelo o endófito en las plantas. De ahí la importancia de su masiva utilización en el control biológico.

1.1 Objetivos:

- Identificar y caracterizar molecularmente los aislamientos seleccionados de *T. harzianum*

1.2 Identificación específica a través de regiones conservadas del ADN

Los ribosomas son estructuras celulares compuestas de RNA (rRNA) y proteínas ribosómicas. En ellos ocurre la traducción de los RNA mensajeros (mRNA) a una cadena polipeptídica (proteína) que es el producto final de la expresión de un gen estructural. Las estructuras de los ribosomas, tanto en organismos procariontes como eucariotes, es similar pero varía su tamaño, el cual se mide por unidades S (Svedberg) de sedimentación de las partículas luego de ser centrifugadas.

Los Eucariotes poseen ribosomas de 80S formados por una subunidad de 40S y otra de 60S. La subunidad de 40S está formada por 33 proteínas y un RNA ribosómico de 18S (18S RNA) (Figura 24), esta se denomina subunidad ribosomal pequeña (SSU). La subunidad de 60S está integrada por 49 proteínas y 3 tipos de moléculas de rRNA que son: 5S, 5.8S y 28S (5S rRNA, 5.8S rRNA y 28S rRNA). Los rARN 28S y 5.8S están asociados a la subunidad ribosomal grande (LSU) (Figura 24). A diferencia de las bacterias, que la identificación se realiza sobre el gen 16 S rRNA, la

identificación taxonómica de los hongos es sobre la base de secuencias de la subunidad ribosómica pequeña, el 18S rRNA (Anderson & Cairney, 2004).

En los hongos filamentosos y levaduras, el rDNA está organizado como unidades que se repiten una detrás de la otra, en tándem. Cada unidad incluye tres genes de rRNA, el que codifica para el 18S rRNA, el gen para el 5.8S rRNA y el gen para el 28S rRNA, como se observa en la Figura 24.

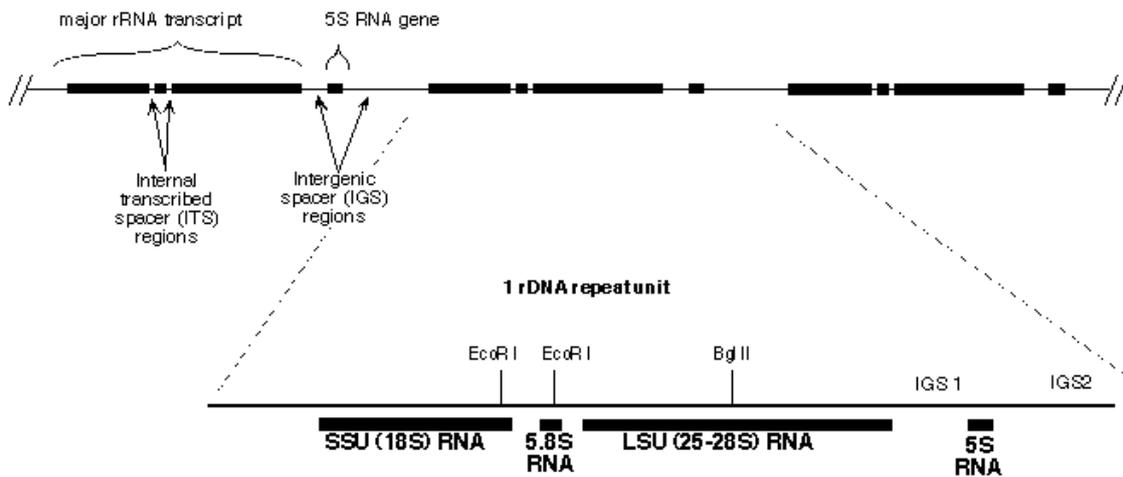


Fig.24. Esquema de la codificación a nivel del ADN y molécula del ARN de la subunidad ribosomal pequeña y de la subunidad ribosomal grande del ribosoma

En cada unidad, los genes están separados por dos secuencias espaciadoras internas que se transcriben junto a los genes de rRNA, denominados ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer), que no son codificantes. El tamaño de los ITS es de entre 200 y 400 pares de base (Figura 24 y 25). Además, estas unidades de rDNA se encuentran separada por un espaciador intergénico IGS (Inter Genic Spacer). El gen más pequeño, el 5S rRNA puede estar o no incluido en la unidad de rDNA (Figura 24)

Las zonas no codificantes del rADN nuclear (ITS1, ITS2 e IGS) son las más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de la identificación y tipificación de especies fúngicas (Gardes & Bruns, 1993). Existen numerosos trabajos que utilizan los ITS para determinar y tipificar individuos del género *Trichoderma* y así como otros géneros de hongos superiores (Grondona *et al.*, 1997; Larena *et al.*, 1999; Hagn, 2003)

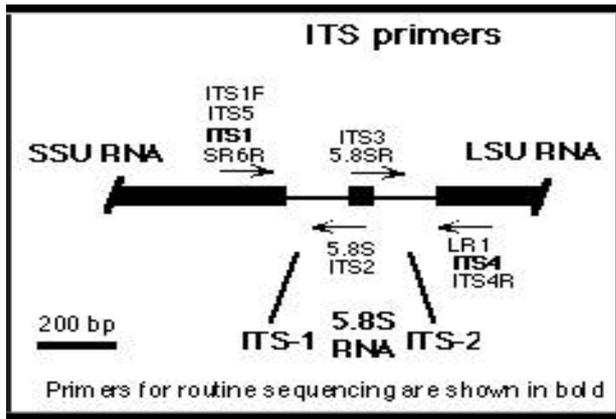


Fig. 25 Esquema de las regiones de ITS-1, ITS-2 e ITS-4 del ARN ribosomal.

Los ITS han sido de gran utilidad para la sistemática molecular a nivel de especie, e incluso dentro de las especies ya que han servido, por ejemplo, para identificar razas geográficas. Debido a su mayor grado de variación que otras regiones génicas de rADN, la variación entre los distintos rDNA se repite a veces y se observa en ambas regiones ITS e IGS. Además, la mayoría de los laboratorios utilizan las regiones ITS1 e ITS4, como primers específicos que permiten la amplificación selectiva de secuencias de hongos.

Sin embargo, en este momento un solo gen no se considera suficiente para caracterizar las especies de *Trichoderma* e *Hypocrea* y las nuevas especies se resuelven utilizando múltiples genes, incluyendo los polipeptidos que codifican polipeptidos de la actina, calmodulina, endoquitinasa, y el factor de elongación (Samuels, 2006). Cada una de las 83 especies de *Trichoderma* que se encuentran en el GenBank se representan por secuencias de al menos la región ITS del rDNA, y la mayoría están representados por secuencias del gen del factor de elongación de traducción-proteína-codificación $1-\alpha$ (*tef*). Aunque en general la región ITS es específica de la especie, las identificaciones basadas en secuencias de ITS se deben utilizar con precaución ya que las especies a veces estrechamente relacionadas no se pueden distinguir con este gen. Esto es especialmente cierto de la sección *Trichoderma* que incluye *T. viride*, donde más de una especie pueden compartir la misma secuencia de SSU (Samuels, datos no publicados).

Sin embargo, existen varios estudios donde se desarrollaron cebadores específicos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar

aislamientos de *T. harzianum*. Rubio *et al.* (2005) desarrollaron dos oligonucleotidos (Q2413f y Q2413r) para detectar la cepa biocontroladora de *T. harzianum* 2413 en el suelo. El par de cebadores, fue diseñado para el fragmento de 1,5 kb amplificado de *T. harzianum* 2413, generando un marcador SCAR (secuencia caracterizada de la región amplificada). El inconveniente de estos cebadores es que sólo es aplicable a la cepa *T. harzianum* 2413 en particular. Miyazaki *et al.* (2009) estudiaron como detectar directamente *T. harzianum* de cultivos de hongos comestible infectados. Con este fin desarrollaron dos cebadores específicos, THITS-R3 y THITS-F2, para la detección por PCR de una amplia gama de cepas *T. harzianum* sobre la base de la secuencia de la región ITS.

1.3 Variabilidad genética intraespecífica

Un marcador molecular permita distinguir diferencias, o sea polimorfismos, en las secuencias de ADN. Los marcadores moleculares pueden ser: o fenotipos moleculares oriundo de un gen expresado (ejemplo isoenzimas) o un segmento específico de ADN correspondientes a regiones expresadas o no del genoma.

Para determinar el polimorfismo entre los individuos, en los últimos años se han generado numerosos protocolos basados en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Muchas de ellos son sencillos y utilizan solo una pequeña cantidad de ADN. Tres son las más ampliamente utilizadas, estos son RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) SSRs o microsatélite (Simple Sequence Repeats) y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphic) (Bornet & Branchard, 2001). Los marcadores RAPDs son muy rápidos y fáciles de desarrollar pero muy difícil de reproducir ya que esta técnica es muy sensible a las alteraciones de protocolo (Bornet & Branchard, 2001). El protocolo con AFLP es de mediana reproducibilidad, pero requiere una labor operacional intensiva y el desarrollo es de un costo medio. La técnica con microsatélite es específica y revela un alto polimorfismo, aunque requiere el conocimiento de las secuencias genómicas para diseñar los cebadores específicos. De esta forma esta técnica se limita a especies que tienen las secuencias de ADN disponibles.

La selección de la técnica de marcadores moleculares depende de que sea reproducible y de su simplicidad. En 1994 se generó una nueva técnica llamada ISSR (Inter simple sequence repeat). Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios, amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia

de un primer de alrededor de 15 bases complementarias a un microsatélite. Diseñados para unirse a las repeticiones en tándem de di y trinucleótidos (Bornet & Branchard, 2001). Los ISSRs permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Cada banda obtenida corresponde a secuencias de ADN delimitadas por 2 microsatélites invertidos. Presentan las ventajas de los marcadores RAPDs ya que son fáciles de utilizar y rápidos. Y además tienen la ventaja, de poseer una alta reproducibilidad, esto nos permite que los resultados obtenidos en distintos laboratorios sean comparables.

La técnica ISSR se utiliza para estudios de diversidad genética, estudios taxonómicos (relaciones fenéticas), elaboración de mapas genéticos y mapeo de genes (Dinolfo *et al.*, 2010; Kumar & Sharma, 2011; Consolo *et al.*, 2012; Simón *et al.*, 2012)

2. Materiales y métodos.

2.1 Acondicionamiento del micelio

Cada aislamiento de *Trichoderma* se sembró sobre APG al 2% en cajas de Petri para ser recuperada del papel de filtro, forma en que se encuentran conservadas. Se tomó un trozo de 1 cm x 1 cm del micelio crecido sobre el medio y se lo colocó en medio líquido, extracto de papa glucosado con antibiótico (cloranfenicol 500 mg/L). Cada cepa fue incubada a temperatura ambiente en agitación continua (150 rpm) durante 5 días.

Para cosechar el micelio, se centrifugó durante 20 minutos a 3500 rpm, a una temperatura de 4 °C, dos veces consecutivas. La primera vez con el medio líquido en el cual creció el hongo y la segunda con agua destilada estéril. Una vez eliminado el sobrenadante, se filtró el micelio sobre papel de filtro, colocándolo por último en eppendorf para luego ser liofilizado.

2.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó 100 mg de micelio del hongo en estudio. Se realizó siguiendo una versión modificada del método (Murray & Thompson 1980) que utiliza bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). En total, se añadieron 750 µl de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM de EDTA, 250 mM de NaCl, y 2% CTAB) y 15 µl de 2-mercaptoetanol al micelio liofilizado y se incubaron a 65 °C durante 30 minutos. Las proteínas celulares fueron precipitadas con 300 µl de 3 M de Acetato de potasio (pH 4,8). Después de la centrifugación a máxima velocidad en una microcentrífuga (Hermlle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania), el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo con 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) hasta que la interface se volvió transparente. Los ácidos nucleicos se precipitaron mediante la adición de 750 µl de isopropanol frío seguido de incubación a 4 °C durante 30 min. Después de centrifugación a 17.500 g durante 5 min, el sedimento se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70% y se secó al aire. Luego se suspendió con 100 µl de buffer Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, pH 8 y 1 mM de EDTA).

Se cuantificó la concentración de ADN de cada una de las muestras en un espectrofotómetro, midiendo la absorvancia a 260 nm y se ajustó a una concentración apropiada para ser utilizada. La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,9%.

2.3 Amplificación por PCR para la identificación específica de *T. harzianum* a través de regiones conservadas

Para la identificación de los aislamientos de *Trichoderma* se utilizó la técnica de PCR. En una primera etapa se amplificaron los ADN de cada una de las cepas utilizando los cebadores directo THITS-F2 (CGGGTTTTTTATAATCTGAGCC) y reverso THITS-R3 (CATTCAGAAGTTGGGTG) descritos por Miyazaki *et al.* (2009), los cuales permiten identificar específicamente a *T. harzianum*. Se realizó un doble chequeo de aquellas cepas que presentaron amplificaciones dudosas.

En una segunda etapa se realizó la amplificación de fragmentos de la región (ITS) del ADN ribosomal de cada *Trichoderma*, cuya reacción dio positiva para *T. harzianum*, utilizando los primers ITS1 (5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`) e ITS4 (5`-TCCTCCGCTT ATTGATATGC- 3`) descritos por White *et al.* (1990). Cada fragmento amplificado incluyó las regiones ITS1 e ITS2 e incluyó también el gen 5.8 S

del ADNr. En ambos casos se utilizó un control negativo, mezcla de reacción sin ADN y como control positivo una cepa de *T. harzianum* previamente caracterizada (Consolo *et al.*, 2012).

Las reacciones de PCR en ambos casos se llevaron a cabo en una mezcla de reacción conteniendo 10 ng de ADN genómico, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), KCl 50 mM, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 0,5 mM de cada cebador y 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) como describe Consolo *et al.* (2012).

Las condiciones de amplificación para las reacciones de la primera etapa consistieron en un ciclo inicial de 95°C durante 1 min, seguido por 30 ciclos que consistieron en una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una temperatura de annealing a 63°C durante 90s y una extensión a 72°C por 2 min. Por último una extensión final a 72°C durante 10 min. Para la segunda etapa las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 2.5 minutos, seguido de 30 ciclos, que incluyeron: 15 segundos a 94°C, 1 minuto a 48 °C y finalmente 1 minuto a 72°C. La amplificación se completó con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel que contiene 1 % de agarosa. Los geles se corrieron por 1 hora a 120 V, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron con un sistema de Fotodyne (Hartland, WI, EE.UU.).

2.4 Secuenciación de fragmentos amplificados de ADN de los aislamientos con mejor comportamiento antagonico y análisis de datos.

Los productos de amplificación de PCR de las 37 cepas con mejor comportamiento biocontrolador se purificaron utilizando el kit Pure Link PCR Product (Invitrogen) y se secuenciaron por Macrogen (Corea) usando el cebador ITS4. Cada secuencia se introdujo en el Genbank y se compararon con otras secuencias depositadas (búsqueda BLAST) (Altschul *et al.*, 1997). Todas las secuencias obtenidas en este estudio serán depositadas en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) con su correspondiente número de acceso.

2.5 La variabilidad genética de los aislamientos de *Trichoderma harzianum*.

Se determinó la variabilidad genética de 37 cepas de *Trichoderma harzianum* con excelente capacidad biocontroladora. Para esto se utilizaron seis oligonucleótidos

ISSR (Stenglein & Balatti, 2006; Moreno *et al.*, 2008; Consolo *et al.*, 2012) CT(AC)8 - (KA5); (AG)8TA -(AA3); ACA(CAA)5 (IA5); (GA)8ACC (FA3); (CAA)5ACG (DA3) y TCA(GT)8 (GA5) que se pusieron a prueba para analizar la diversidad genética entre los aislados de *Trichoderma*. La amplificación de los loci ISSR se llevó a cabo separadamente con cada uno de los oligonucleótidos en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient en volumen final 25 µL, conteniendo 10 ng de ADN genómico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 2,5 mM de cada oligonucleótido, y 1 unidad de Taq polimerasa (Promega).

Las condiciones de ciclado fueron una desnaturalización inicial a 94°C durante 7 min, seguido de 33 ciclos a 94°C para 60 s, 75 s de 48°C y 72°C durante 4 min. Una extensión final de 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de Agarosa al 1,5% (Invitrogen Carlsbad, CA, EE.UU.), en tampón TAE (40 mM de Tris-HCl, pH 8, y 1 mM EDTA). Los geles se corrieron durante 4 horas a 100 V, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron con equipo de foto documentación (Hartland, WI, EE.UU.) (Consolo *et al.*, 2012).

2.5.1 Análisis de los datos

2.5.1.1 Análisis de datos genéticos

El análisis de los datos obtenidos a partir de los marcadores moleculares ISSR se realizó mediante los programas Phoretix 1D (TotalLab), Excel 8.0, NTsys (Rohlf, 1998), Bootstrap (Yap & Nelson, 1996).

2.5.1.2 Generación de la matriz básica de datos

La matriz binaria básica de datos fue construida en forma de tabla con el programa EXCEL 8.0. Las columnas correspondieron a las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, del inglés Operacional Taxonomic Units) correspondientes a los aislamientos de *T. harzianum* analizados, y las filas correspondieron a las variables (bandas de marcadores).

Los geles se leyeron con el programa Phoretix 1D. Los datos se convirtieron a variables binarias de la siguiente manera: Cada producto de amplificación observado y reproducible para cada marcador analizado, con una movilidad electroforética determinada y correspondiente a una banda en el gel, se le asignó el valor de 1 si

estaba presente en cada aislamiento y a la ausencia el valor 0. Cada banda fue considerada reproducible cuando habiendo realizado dos extracciones independientes de ADN amplificaron claramente el mismo fragmento para cada aislamiento estudiado.

2.5.1.3 Relación genética entre los aislamientos: Obtención de la matriz de similitud y generación del dendrograma

Para determinar la relación genética entre aislamientos se compararon de a pares los perfiles de bandas generados para cada aislamiento por cada marcador ISSR estudiado. Se construyó una matriz de similitud que combinó todos los polimorfismos detectados entre los aislamientos, utilizando el coeficiente de DICE (Sneath & Sokal, 1973) el cual se calcula mediante la fórmula

$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, donde N_x y N_y son los números de fragmentos en los aislamientos x e y , respectivamente y N_{xy} es el número de fragmentos compartidos por x e y . Este coeficiente permite comparar pares de aislamientos de acuerdo con las bandas compartidas, excluyendo la ausencia de bandas simultáneas. Se realiza por lo tanto una doble ponderación de las bandas que coinciden, diferenciando mejor individuos con baja similitud. A partir de los datos generados se construyó un dendrograma por el método de agrupamiento UPGMA (agrupamiento promedio no ponderado de las medias aritméticas) (Sneath & Sokal, 1973) que define la distancia entre dos grupos o conglomerados como el promedio de todas las distancias de a pares entre elementos de un grupo y elementos del otro grupo y que permite visualizar la relación en grados de similitud entre los aislamientos analizados.

Todos estos análisis se realizaron utilizando el software estadístico NTSYS 2,1 (Rohlf, 1998)

2.5.1.4 Generación de la matriz cofenética

Dado que las técnicas que se utilizan para la construcción de los dendrogramas no reflejan en forma exacta la información de la matriz de similitud, (ya que pueden producirse distorsiones de las relaciones de las mismas al realizar una representación bidimensional), el coeficiente de correlación cofenético, mide la correlación entre las interdistancias en el dendrograma y las interdistancias en la matriz de distancia sobre la que se aplicó el procedimiento. Para tener una medida de la distorsión producida en el dendrograma, se construyó a partir de la información del dendrograma la matriz cofenética y se correlacionó con la matriz de similitud original, utilizando el test de

correspondencia de matrices de Mantel (Sokal & Rohlf, 1995) mediante el uso del programa NTSYS 2.1. Por lo tanto la fiabilidad del dendrograma fue establecida mediante el cálculo del coeficiente de correlación cofenética (CCR) y realizando 1000 permutaciones aleatorias.

2.5.1.5 Medida de confianza por re-muestreo o Bootstrapping

Bootstrap (Efron, 1979) es un método numérico de re-muestro que en estudios de variabilidad genética, este procedimiento proporciona una estimación empírica de parámetros genéticos y de los errores estándares necesarios para construir un intervalo de confianza. Este análisis crea una matriz de datos cuyas columnas se van cambiando de forma aleatoria, e incluso se repiten en una misma matriz, y de cada una de las matrices resultantes crea un dendrograma, contando al final en cuantos de ellos aparece el clado a estudiar. Este proceso se repite varias veces y finalmente se indica el porcentaje de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices remuestreadas. Por último todos estos árboles se representan en uno, consenso donde aparecen los porcentajes de la proporción de cada réplica. Para determinar los valores de bootstrap, los cuales representan la fiabilidad y robustez del dendrograma generado, se utilizó el programa Winboot calculando 1000 repeticiones (Yap & Nelson, 1996).

2.5.1.6 Análisis de la variabilidad genética

Para estimar la diversidad genética de la entre los aislamientos de *T. harzianum* en estudio y considerando que los marcadores ISSR son marcadores dominantes, se determinaron los siguientes parámetros:

- el número de loci polimórficos (np),
- el número de loci no polimórficos (nnp).
- el número total de loci ($n = np + nnp$),
- el porcentaje de polimorfismo/ oligonucleótido ($\%P = np / \text{total de loci}$)

Se calculó la diversidad genética determinando el valor de PIC (contenido de información polimórfica) para cada locus, de acuerdo a la fórmula $1 - p^2 - q^2$ donde p y q representan las frecuencias alélicas siendo “p” la frecuencia de la presencia del

marcador (alelo 1) y “q” es la frecuencia de la ausencia del marcador (alelo 2) (Ghislain *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 1996)

Se calculó diversidad génica promedio (H_i) o valor PIC promedio de acuerdo a la fórmula $1-p^2-q^2/n^0$ total de loci.

3. Resultados

3.1 Amplificación por PCR para la identificación específica de *T. harzianum* a través de regiones conservadas

Se analizaron las 84 cepas que redujeron significativamente la severidad de la enfermedad causada por *S. tritici*. La identificación basada en secuencias de ITS demostraron que el 75 % de las cepas analizadas son *T. harzianum* (Figura 26).

C+ 145 95 78 73 215 135 220 130 94 169 136 137 127

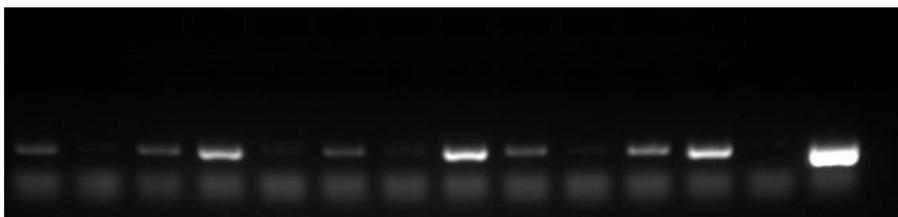


Fig 26 Productos de amplificación obtenidos de 14 aislamientos de *Trichoderma* utilizando los oligonucleótidos directo THITS-F2 (CGGGTTTTTATAATCTGAGCC) y reverso THITS-R3 (CATTCAGAAGTTGGGTG) que confirman la identificación de *T. harzianum*.

Para realizar las pruebas de variabilidad genética y los ensayos enzimáticos y morfológicos, se seleccionaron 37 cepas que presentaron una reducción del 50 % o mayor del área necrosada y/o cobertura picnidial. Además estas cepas fueron identificadas molecularmente como *T. harzianum* con el uso de los primers ITS y confirmada su identidad por la base de datos de Genbank (Tabla 4).

Aislamientos	Origen	Año	Nro de ingreso EMBL	Aislamientos	Origen	Año	Nro de ingreso EMBL
1	Los Hornos	2008	HG940466	123	Manfredi	2010	HG940485
2	Los Hornos	2008	HG940467	129	Manfredi	2010	HG940486
5	Los Hornos	2008	HG940468	131	Manfredi	2010	HG940487
8	Los Hornos	2008	HG940469	140	Manfredi	2010	HG940488
10	Los Hornos	2008	HG940470	141	Manfredi	2010	HG940489
12	Los Hornos	2008	HG940471	160	Lobería	2010	HG940490
26	Los Hornos	2008	HG940472	162	Lobería	2010	HG940491
54	Bragado	2008	HG940473	165	Lobería	2010	HG940492
69	Bordenave	2009	HG940474	170	Lobería	2010	HG940493
73	Bordenave	2009	HG940475	172	Lobería	2010	HG940494
77	Bordenave	2009	HG940476	177	Lobería	2010	HG940495
80	Bordenave	2009	HG940477	181	Pergamino	2011	HG940496
83	Bordenave	2009	HG940478	182	Pergamino	2011	HG940497
92	Paraná	2009	HG940479	183	Pergamino	2011	HG940498
93	Paraná	2009	HG940480	206	Pergamino	2011	HG940499
97	Paraná	2009	HG940481	210	Santa Fe	2011	HG940500
107	Paraná	2009	HG940482	215	Santa Fe	2011	HG940501
108	Paraná	2009	HG940483	229	Santa Fe	2011	HG940502
114	Paraná	2009	HG940484				

Tabla 4. Identificación de las 37 cepas de *T. harzianum* seleccionadas por su capacidad biocontroladora.

3.2 Análisis de la variabilidad genética de los aislamientos de *Trichoderma*

Las 37 cepas se amplificaron con 6 marcadores ISSR, seleccionados según los resultados obtenidos por Consolo *et al.* (2012). En todas las corridas analizadas se determinaron productos de amplificación con una longitud de fragmentos que variaron desde 200 pb hasta 3000 pb, con un promedio de 16 bandas polimórficas para cada marcador. Mediante la amplificación de ADN y utilizando los 6 cebadores descriptos se

obtuvo un total 132 bandas de las cuales el 79,5% fueron polimórficas. Las demás bandas consideradas no informativas o monomórficas fueron descartadas del análisis. La información obtenida para cada oligonucleótido se muestra en la Tabla 5.

Oligonucleotido	Nº de loci totales	Nº de loci polimórficos	Nº de loci monomórficos	PIC promedio
TCA(GT) ₈ (GA) ₅	24	20	4	0,248
CT(AC) ₈ (KA) ₅	30	25	5	0,318
(AG) ₈ TA (AA) ₃	25	20	5	0,289
ACA(CAA) ₅ (IA) ₅	19	14	5	0,243
(GA) ₈ ACC (FA) ₃	22	20	2	0,342
(CAA) ₅ ACG (DA) ₃	12	7	5	0,153

Tabla 5. Información generada a partir del análisis de bandas de los 37 aislamientos de *T. harziaunum* para cada oligonucleótido ISSR

Los valores PIC promedio fluctuaron entre 0,153 y los 0,342, con un promedio global de 0,32 lo cual indica una variabilidad genética media, teniendo en consideración que el valor máximo que podría adquirir este índice es de 0,5 para marcadores de tipo dominante como los utilizados en este estudio.

Un ejemplo de las reacciones de amplificación se observa con los oligonucleótidos CT(AC)₈ -(KA5) y TCA(GT)₈ (GA5) (Figura 27 a y b).

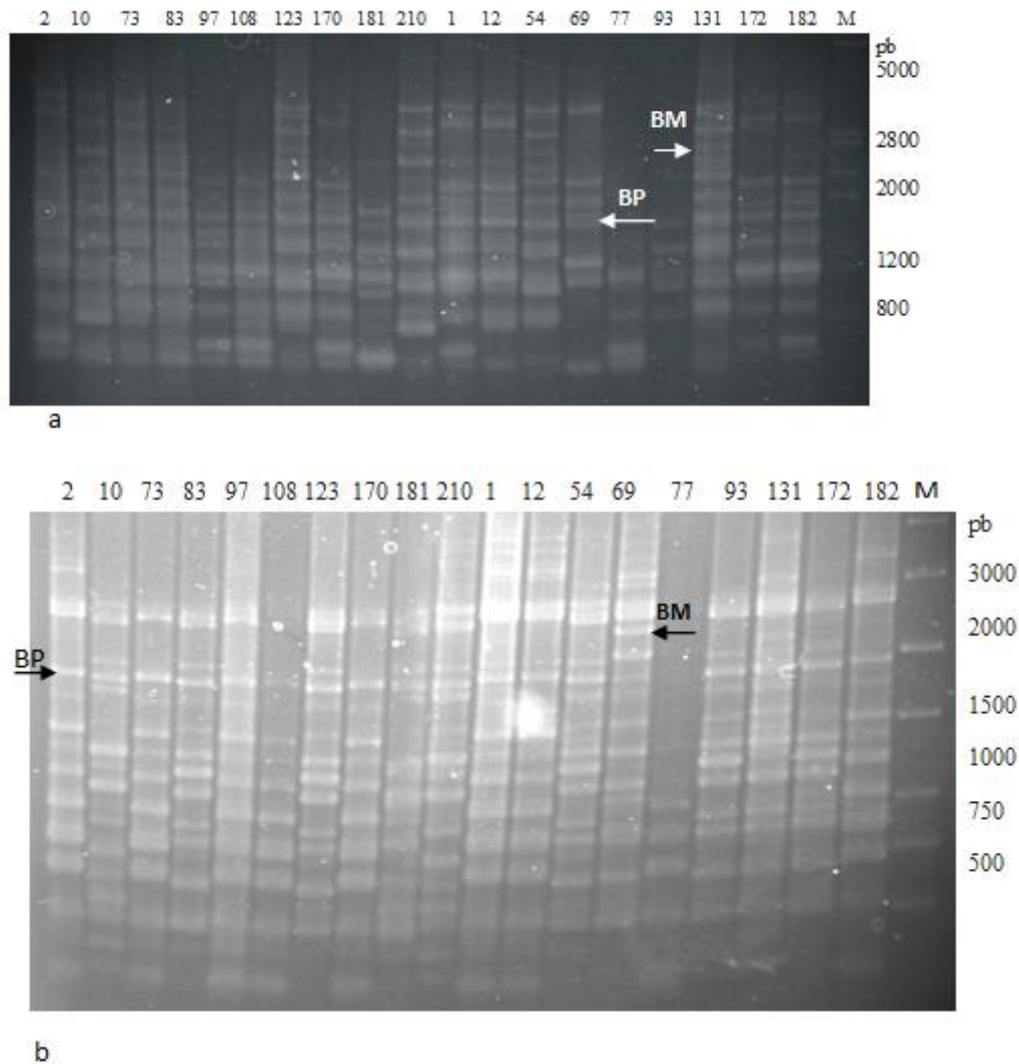


Fig. 27 a y b. Patrones de amplificación de 19 aislamientos de *T. harzianum* con los oligonucleótidos TCA(GT)₈ (a) y CT(AC)₈ (b) M: marcador de peso molecular a) ADN del fago Lambda digerido con la enzima Pst I, b) L1 kpb Plus. (BM) Banda Monomórfica. (BP) Bandas Polimórficas.

El análisis de agrupamiento para los ISSR estudiados permitió identificar 19 haplotipos de *T. harzianum* entre los 37 aislamientos analizados lo cual representa que un 51 % de los aislamientos presentaron un patrón único de bandas (Figura 27). Los aislamientos fueron agrupados en 3 grandes grupos con una similitud entre los grupos del 50% de los cuales el grupo I incluyó 15 aislamientos (2, 10, 26, 69, 73, 80, 83, 92,

93, 97, 107, 108, 114, 123, 129 y 140) el grupo II a los aislamientos (1, 5, 8, 12, 54, 131, 141, 160, 162, 165, 170, 172 y 177) y el grupo III a los aislamientos (77, 181, 182, 183, 206, 215 y 229). El coeficiente de correlación cofenética calculado fue de 0.952 y los valores de bootstrapping mayores al 90 % indicando que el dendrograma generado es una buena representación de la relación genética entre los aislamientos.

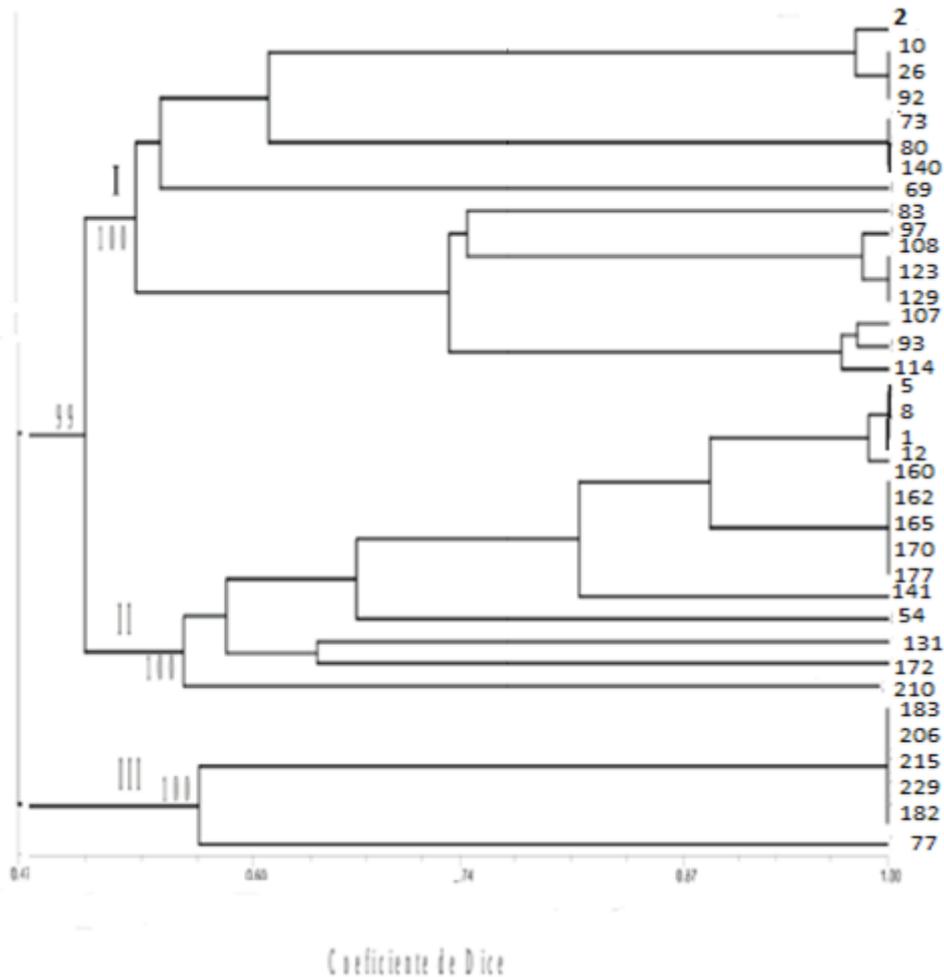


Fig. 28 Dendrograma representando los aislamientos de *T. harzianum* basado en el análisis ISSR. Las distancias genéticas fueron obtenidas por UPGMA a partir de los patrones de bandas amplificadas con los 6 oligonucleótidos ISSR. Valor de escala de 1.0 indica 100% de similitud genéticas.

4. Discusión

La principal ventaja en el uso de PCR para la identificación de microorganismos del suelo como *Trichoderma* es la velocidad con la que se puede obtener información sobre grandes cantidades de aislamientos. Cumagun *et al.* 2000 estudió que la técnica de UP-PCR combinada con el análisis rDNA, ITS1 e ITS2, es un complemento ideal del análisis morfológico, ya que es útil para determinar la taxonomía de *Trichoderma*. Los estudios morfológicos por sí solos pueden ser propensos a errores en las identificaciones de este género (Kuhls *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos en este estudio de identificación, basada en secuencias de ITS, nos muestran que 64 cepas de las 84 mejores biocontroladoras pertenecen a la especie *T. harzianum*. Resultados similares fueron encontrados en China por Zhang *et al.* (2005), en Rusia por Kullnig *et al.* (2000), en el sudeste de Asia por Kubicek *et al.* (2003), en Europa Central por Wuczkowski *et al.* (2003), en Egipto por Gherbawy *et al.* (2004) y en América del Sur por Druzhinina *et al.* (2005). Samuels (2006) determinó que algunas especies de *Trichoderma* poseen una extensa distribución geográfica, mientras que otras especies están limitadas a una región en particular. *T. aureoviride* se encuentra limitada al área del Reino Unido y el norte de Europa (Lieckfeldt *et al.*, 2001). En cambio, *T. harzianum* (Chaverri *et al.*, 2003) y *T. asperellum* (Samuels, observación personal) son especies verdaderamente cosmopolitas. *T. harzianum* e *H. lixii* son especies conocidas en todos los continentes, con excepción de la Antártida. *T. harzianum* y su teleomorfo fueron encontrados en regiones templadas, como EE.UU., Europa Occidental, Reino Unido, Japón; en áreas tropicales y sub-tropicales como México, Tailandia, Indonesia, Camerún, Guayana Francesa y Colombia. También fue encontrada en Tierra del Fuego por Paredes *et al.* (2013) asociada a especies vegetales dominante de la región Moat.

Además, estudios moleculares sobre las regiones del ITS realizados por Kullnig *et al.* (2002), demostraron que las especies de *T. harzianum* son las que presentan más variabilidad genética dentro del género. En el presente trabajo se parte de cepas que previamente fueron seleccionadas por su buena capacidad biocontroladora frente a *S. tritici*. Estudios similares, utilizando cepas seleccionadas debido a su actividad como micoparásitos in vitro, fueron realizados por Hermosa *et al.* (2004) con 69 cepas, procedentes de 16 países diferentes. Esta pre-selección de las cepas del presente estudio podría disminuir la variabilidad innata de las cepas encontradas. No obstante, existe una variabilidad genética intra específica entre las cepas de *T. harzianum*

provenientes de las diferentes áreas de la región triguera. El origen de esta variación podría relacionarse con que *Trichoderma* es un hongo diploide y heterotálico (Seidl *et al.*, 2009). Cepas diferentes tienden a recombinarse y evolucionar rápidamente en función de las frecuencias del tipo de apareamiento. Además, otros mecanismos, tales como mutaciones, la recombinación parasexual y la migración podrían explicar la diversidad genética observada en este estudio (Chaverri *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2009; Harman, 2014).

Los tres grupos de similitud obtenidos en este estudio compartieron cepas de diferente origen geográfico, aisladas en diferentes años y con distinto nivel de antagonismos. Coincidiendo con Sharma *et al.* (2009) en el presente trabajo, tampoco se vio relación entre el polimorfismo, la agresividad y el origen de las cepas. A diferencia de este estudio, Kumar & Sharma (2011), utilizando distintos tipos de marcadores moleculares (ISSR y RAPD) y morfológicos relacionaron la variación entre las cepas de *T. harzianum* y sus diferentes comportamientos antagónicos. Consolo *et al.* (2012) observaron una correspondencia parcial entre los patrones de polimorfismo y la agresividad de los aislamientos. Contrariamente a nuestros resultados, Muthumeenakshi *et al.* (1994), con las técnicas de RFLP, RAPD y el análisis de la secuenciación del espaciador interno transcrito (ITS), lograron asociar el polimorfismo de las cepas de *T. harzianum* con su agresividad en el cultivo de champiñón, agrupándolas todas en un cluster. La ambigüedad que se revela en todos estos resultados, estaría sugiriendo que los aislamientos han desarrollado sus diferencias a través de la selección establecida por determinadas condiciones ambientales o ecológicas (Sharma *et al.*, 2009).

Por otra parte, en este estudio, se observaron que todas las cepas pertenecientes a la localidad de Lobería se agruparon en el cluster II y aquellas que fueron aisladas de la localidad de Paraná se ubicaron en el cluster I, lo que podría determinar una relación parcial por su origen. Pero para comprobar esta relación habría que ampliar el número de cepas de cada localidad, dado que para alguna de las zonas evaluadas solo poseían un representante.

Es difícil predecir el comportamiento de un agente biocontrolador en un patosistema natural. La correcta selección del antagonista, se inicia con la identificación exacta de las cepas a nivel de especie. Este es el primer paso en la utilización de todo el potencial de estos hongos en aplicaciones sobre un cultivo destinadas para el control de una enfermedad (Lieckfeldt *et al.*, 1999). Por lo tanto es

de gran importancia conocer el patrón genético de todas las cepas. Esto permitirá realizar un monitoreo del microorganismo durante todo el proceso de formulación e incluso un seguimiento del patrón genético a campo para asegurar su identidad.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS DE *T. harzianum*

1. Introducción

Trichoderma harzianum Rifai (1969) pertenece al género *Trichoderma*, Sección *Pachybasium* determinada por Bisset (1991a). Esta sección se caracteriza por tener conidióforos y fiálides bien amplios y turgentes que dan una apariencia robusta y rígida.

T. harzianum como la mayoría de las especies de *Trichoderma*, se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y emiten grandes cantidades de conidios verdes formados a partir de una célula conidiógena, enteroblástica fialídica. Los conidióforos son muy ramificados (asemejándose a arbustos con forma piramidal), están tabicados y sus células contienen más de un núcleo. Son macronematosos o sea de gran tamaño y bien diferenciados de las células conidiógenas (Figuras 29 y 30). Generalmente, los conidióforos están ramificados de a pares. Las ramificaciones pueden medir hasta 150 μm de largo. Las ramas más largas están más próximas a la base y al eje principal. Las ramificaciones basales se insertan con un ángulo de 90° y en las superiores, el ángulo de inserción es menor a 90° (Samuels *et al.*, 2013).

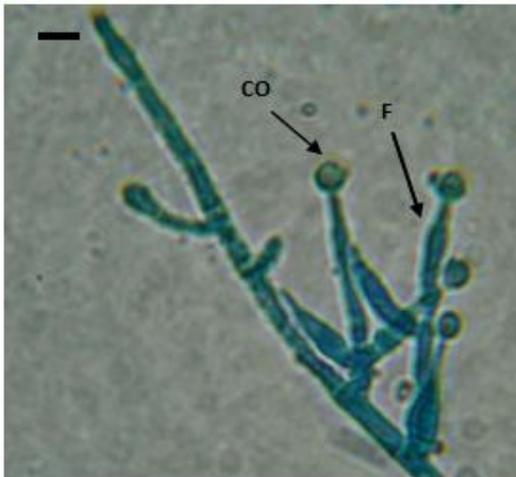


Fig.29 Observación microscópica de fiálides y conidios de *T. harzianum* (aumento 100 X) (— :8mm=5 μm). Detalles de los conidios (CO) y de las fiálides (F).

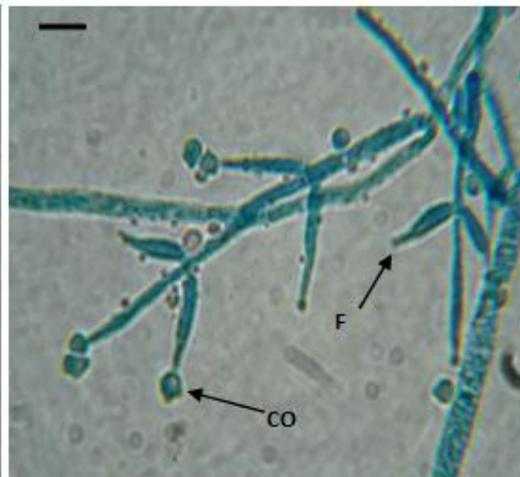


Fig. 30 Observación microscópica de fiálides y conidios de *T. harzianum* (aumento 100 X) (— :8mm=5 μm). Detalles de los conidios (CO) y de las fiálides (F).

Las células conidiógenas se denominan fiálides. Poseen “forma de botella”, son angostas en la base, luego se ensanchan y terminan en un cuello largo y estrecho (Figuras 29 y 30). Las fiálides tienen un tamaño promedio de entre 6,5-6,7 μm . La relación largo ancho es 2,1-2,2. Pueden estar agrupadas o solitarias. En el caso de estar agrupadas se insertan en verticilos de 2 a 4 fiálides y se mantienen a 90° con respecto a las hifas que las sostienen. Los conidios se generan de manera basípeta a partir de un extremo abierto de la fiálide. Estos conidios son globosos a subglobosos u ovoides, con la pared normalmente lisa y con un solo núcleo. Su tamaño varía entre 1,7-3,2 x 1,3-2,5 μm , siendo lo más común 2,4 x 1,9 μm (Figuras 31 y 32). Estas esporas son pigmentadas de color verde pálido (Bissett, 1991). La relación largo ancho de los conidios es de 1,1 a 1,2 (Samuels *et al.*, 2013).

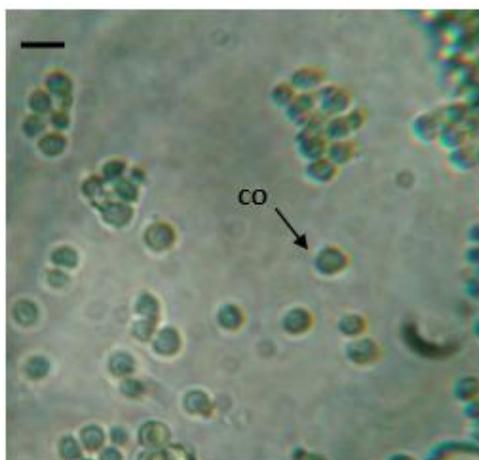


Fig.31 Observación microscópica de los conidios de *T. harzianum* (aumento 100 X) (— : 8mm=5 μm). Detalles de los conidios (CO).

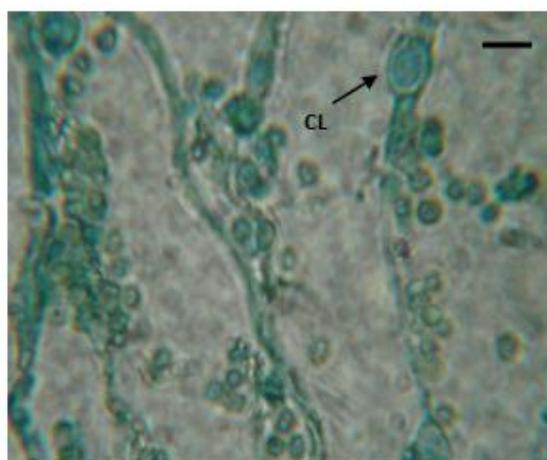


Fig.32 Observación microscópica de conidios y clamidosporas de *T. harzianum* (aumento 100 X) (— : 8mm=5 μm) Detalle de una clamidospora (CL).

Las hifas del micelio son hialinas, de paredes lisas y con un diámetro de 2 a 7 μm . En determinadas condiciones nutricionales o frente a la desecación, producen unas estructuras de resistencia denominadas clamidosporas. Estas esporas, tienen una conidiogénesis del tipo tálico, donde las hifas preexistentes se transforman en clamidosporas. Suelen ser abundantes, pueden ubicarse intercaladamente en las hifas o ser terminales, pero en algunos cultivos no se encuentran (Figuras 33 y 34). Son

generalmente solitarias, pero a veces se pueden unir entre dos o más. El contenido de la clamidospora es subhialino, amarillo pálido y su color cambia a marrón con el paso del tiempo. Estas esporas, que se forman sobre el micelio, son subglobosas elipsoidales o piriformes, su tamaño varía de 4 a 12 μm de diámetro. Las paredes son hialinas y pueden tener un espesor de 1 μm más gruesas que las de los conidios. Estas estructuras son de vital importancia para la supervivencia del género en el suelo y bajo condiciones adversas. (Lewis & Papavizas, 1984; Martínez *et al.*, 2013).

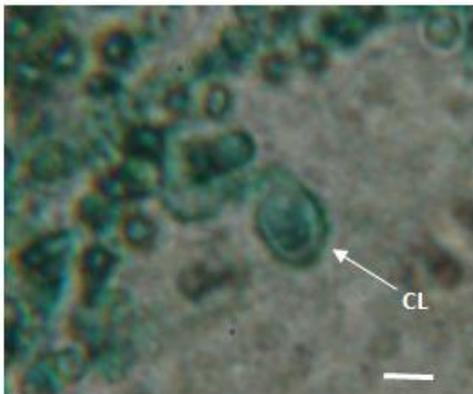


Fig.33 Observación microscópica de clamidosporas terminales de *T. harzianum* (aumento 100 X) (— : 8mm=5 μm). Detalle de la clamidospora (CL).

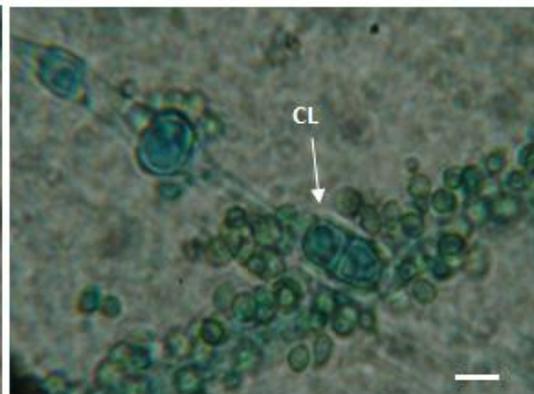


Fig.34 Observación microscópica de clamidosporas intercalares de *T. harzianum* (aumento 100 X) (— : 8mm=5 μm). Detalle de las clamidosporas (CL).

T. harzianum se caracteriza por un rápido crecimiento de sus colonias, en caja de Petri con Agar Papa Glucosado 2% (APG). Alcanzan un diámetro de 7 a 9 cm en 72 h. Al comienzo de su crecimiento, generan abundante micelio aéreo de color blanco grisáceo, luego su color cambia al verde oscuro, por la gran masa de conidios que se generan. En muchas colonias los conidios son primero de color amarillos, llegando a ser de color amarillo-verdoso al madurar. Raramente las colonias de *T. harzianum* son amarillas (Samuels *et al.*, 2013). El crecimiento en las cajas de Petri es en forma concéntrica (Figura 35). El color con que se tiñe el medio de cultivo puede variar de amarillo opaco a incoloro. Algunas cepas poseen olor ligeramente terroso, otras el olor es indistinguibles (Bisset, 1991). La temperatura óptima de crecimiento de *T. harzianum* "in vitro", es de 30 °C en APG y 25 °C en el medio SNA (medio sintético bajo en nutrientes, Nirenberg 1976). Después de 96 h a 30 °C en la oscuridad la

superficie del medio de cultivo Harina de maíz - dextrosa - agar (CMD) mostró una cobertura total de conidios, de color verde oscuro, a excepción del centro de la colonia con el micelio que se mantuvo estéril formando pústulas (pequeñas elevaciones ampuliformes formadas por agregados de conidióforos, Ulloa & Hanlin 2006).



Fig.35 Observación de pústulas de coloración verdosas y formación de anillos concéntricos de cultivo *in vitro* de *T. harzianum* sobre medio Czapek's -agar.

El tamaño de los conidios y la forma de los mismos son las características que se utilizan para diferenciar *T. harzianum* de las de otras especies de *Trichodermas*. Otra característica es que no poseen conidióforos que tengan hifas apicales estériles.

La taxonomía tradicional, que se basa principalmente en las características morfológicas y del cultivo del hongo, encuentra la dificultad de que “el género *Trichoderma* posee un estrecho rango de variación en su morfología” según Samuel, 2006. Dada la complejidad en identificar las diferentes especies de este género y para estudiar las relaciones entre los aislamientos de la especie *T. harzianum* es recomendable utilizar un enfoque que combine características fisiológicas, morfológicas y moleculares (Grondona *et al.*, 1997; Lieckfeldt, *et al.*, 1999; Hermosa *et al.*, 2004; Consolo *et al.*, 2012).

1.2 Objetivo

-Caracterizar morfo-culturalmente las 37 cepas en estudio que fueron seleccionadas por su capacidad antagónica.

2. Materiales y métodos

Se realizaron los estudios de caracterización morfológicas sobre las 37 cepas de *T. harzianum* generadas a partir de los cultivos monospóricos. Estas cepas fueron previamente identificadas y caracterizadas molecularmente (Capítulo II).

2.1 Acondicionamiento de las cepas

Cada cepa, que se encuentra conservada con la técnica del papel de filtro (Stocco *et al.*, 2010), se recuperaron sobre APG 2% con antibiótico, en cajas de Petri. Se incubaron durante 7 días a 26°C en oscuridad.

2.2 Estudios morfológicos de *Trichoderma harzianum*

2.2.1 Radio de la colonia

Con el fin de medir el crecimiento de la colonia se utilizó el medio de cultivo Czapek's Agar (Smith, 1960) (Cz agar).

La composición de este medio es la siguiente:

Nitrato de sodio (NaNO ₃)	2,0 g
Fosfato ácido de potasio (K ₂ HPO ₄)	1,0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ * 7H ₂ O)	0,5 g
Cloruro de potasio KCL	0,5 g
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ *7H ₂ O)	0,01 g
Sacarosa	30,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 L

En el centro de las cajas de Petri de 9 cm de diámetro se sembró, un taco circular de APG (8 mm de diámetro x 2 mm de espesor) cubierto de micelio y esporas, de cada una de las cepas en estudio. De cada uno de los aislamientos se organizaron tres repeticiones. Se incubaron en estufas a 26°C, en oscuridad continua, durante la duración el ensayo. El crecimiento de las colonias se evaluó diariamente, mediante dos mediciones perpendiculares entre sí. También se determinó la coloración de las colonias y del medio, a través de la carta de colores (Rayner, 1970). El tiempo final del ensayo quedo determinado cuando la primera cepa de *T. harzianum*, entre todas las sembradas, alcanzó los 8 cm de diámetro.

2.2.2 Tamaño de conidio

Cuando el crecimiento de las colonias llegó a su tiempo final el ensayo se interrumpió colocando una ansada de conidios de cada una de las cepas en un eppendorf que contenía una mezcla de agua destilada estéril y alcohol etílico 96° (70:30 v/v), para conservar los conidios sin modificaciones. Se agitó y se tiñó con azul de anilina antes de cada medición. Los conidios se midieron en el microscopio con un aumento de 100x utilizando aceite de inmersión. Por cada cepa, se realizaron 100 mediciones de conidios y por cada conidio se tomaron 2 medidas de sus diámetros, perpendiculares entre sí.

2.2.3 Presencia y ubicación de las clamidospora

Veinte días después de finalizado el ensayo de crecimiento de las colonias se determinó la presencia de las clamidosporas y su ubicación en el micelio. La elección del tiempo final se basó en los antecedentes publicados por (Rifai, 1969; Bisset 1991). *Trichoderma harzianum* alcanza la madurez de la colonia y forma clamidosporas, aproximadamente a los 15 días de crecimiento. La extensión en 5 días más del punto final garantizó que las diferencias en la formación de esta estructura de resistencia fuera un carácter inherente al aislamiento y no sólo producto de la mencionada madurez. Las cajas de Petri durante ese periodo, se mantuvieron a temperatura ambiente. Por cada cepa en estudio, se realizaron 2 preparados con una membrana transparente con adhesivo y se tiñeron con azul de anilina. Cada preparado se observó al microscopio con un aumento 100x con aceite de inmersión. Se evaluó la presencia o ausencia de clamidosporas y en el caso de encontrarla, se determinó su ubicación, ya sea terminales o intercalares en la hifa que le dio origen.

3. Resultados

3.1 Radio de la colonia

El tiempo final del ensayo se determinó a las 72 h después de la siembra. Solo las cepas 8, 10, 73, 141 y 170 presentaron un crecimiento inferior a los 8 cm de diámetros.

A las 24 h después de la siembra, en todas las cepas se observó un micelio hialino y el diámetro de las colonias varió entre 1 a 3 cm (Figura 36 a). A las 48 h el color del micelio cambió a blanco algodonoso en la mayoría de las cepas (Figura 36

b). Al finalizar el ensayo (72h), las cepas 1 y 8 mantuvieron el micelio hialino sin formar esporas. El resto de las cepas presentaron colores que variaron dentro de las series III Twice-greayed Series y IV Thrice-greayed Series (Figura 36 c). El 24% de las cepas tuvieron una combinación de Dark Herbage Green (69) en la zona más antigua del micelio y Greenish glaucous (91) en la zona más joven del micelio. El 10% de las cepas presentaron la combinación Dark Herbage Green (69) en la zona más antigua del micelio y Malachite Green (72) en la zona más joven del micelio. En el resto de las cepas se observaron coloraciones uniformes de Greyish yellow-green (68); Pistachio green (92) y Yellow-Green (71) (Rayner, 1970).

Todas las cepas crecieron formando círculos concéntricos. Comenzando a verse la formación de conidios a los tres días. Ninguna de las cepas produjo cambios de la coloración del medio de cultivo durante todo el ensayo.

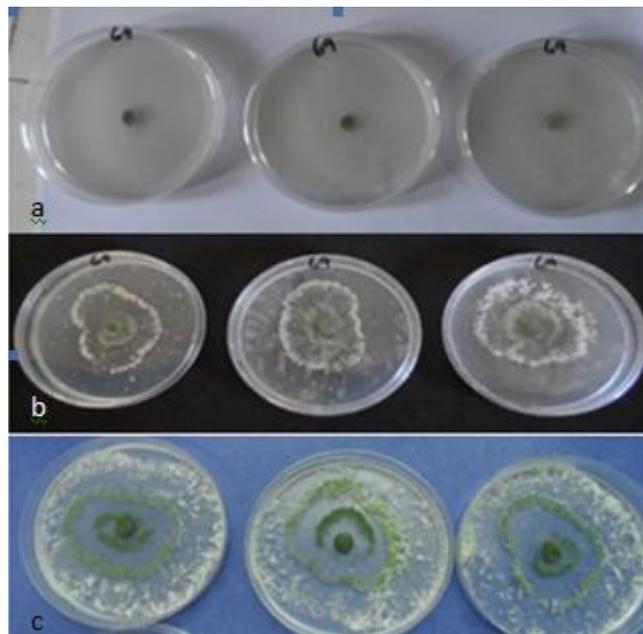


Fig. 36 a, b, c Diámetro de la colonia de *T.harzianum* (cepa 69) en medio Cz- agar a 26 °C. (a) a las 24h de la siembra; (b) a las 48h de la siembra; (c) a las 72 h de la siembra.

3.2 Tamaño de conidio

Las 37 cepas estudiadas no presentaron diferencias en forma y tamaños de los conidios. Los conidios de todas las cepas presentaron forma globosa a ligeramente

ovoide. El diámetro de los mismos varió entre 2,42- 2,96 x 2,45-3,03 μm . Todos los conidios presentaron color verde.

3.3 Presencia y ubicación de las clamidospora

Los resultados obtenidos en la evaluación de la presencia de clamidosporas se observan en la Tabla 6. El 27 % de las 37 cepas estudiadas no formaron clamidosporas durante el tiempo de duración del ensayo. De aquellas cepas que formaron clamidosporas, el 59% se ubicaron de manera intercalar, el 26 % se ubicaron tanto terminales como intercalares y solo el 15% de las cepas formaron clamidosporas terminales.

Cepas	Presencia de clamidosporas	Ubicación de las clamidosporas
1	+	Terminales
2	+	Intercalares/terminales
5	+	Intercalares
8	-	
10	-	
12	-	
26	+	Intercalares
54	+	Intercalares/ terminales
69	-	
77	-	
80	+	Intercalares/ terminales
83	+	Intercalares/ terminales
73	+	Intercalares
92	+	Intercalares
93	+	Intercalares/ terminales
97	+	intercalares
107	-	

Cepas	Presencia de clamidosporas	Ubicación de las clamidosporas
108	-	
114	+	Intercalares
123	+	Intercalares/ terminales
129	+	Intercalares
141	+	Intercalares/ terminales
131	+	Terminales
140	+	Intercalares
160	+	Intercalares
172	+	Intercalares
162	+	Intercalares
165	+	Intercalares
170	+	Intercalares
177	+	Terminales
181	-	
182	-	
183	+	Intercalares
210	-	Intercalares
229	+	Intercalares
215	+	Terminales
206	+	Intercalares

Tabla 6. Presencia y ubicación de las clamidospora en las hifas de *T. harzianum*

4. Discusión

Según Lieckfeldt *et al.*, (1999) la utilización de todo el potencial biocontrolador de las especies de *Trichoderma* requiere la identificación y la caracterización morfológica y molecular de las cepas a nivel de especie. Varios autores indicaron las dificultades para distinguir las especies sobre la base de los caracteres morfológicos (Seaby, 1996; Waalwijk *et al.*, 1996; Samuels, 2006). También destacaron que los rasgos morfológicos son sometidos a la influencia del medio ambiente y pueden provocar grandes variaciones entre un cultivo y otro. Por esta razón, la ubicación taxonómica de las especies resulta difícil cuando se emplean solo aspectos morfológicos y en la actualidad se recurre también a la utilización de herramientas moleculares, que contribuyen a la identificación específica (Samuels, 2006; Kumar & Sharma, 2011; Martínez *et al.*, 2013).

Características como un alto grado de esporulación, una elevada tasa de crecimiento, la rápida colonización de los sustratos, acompañados de una elevada actividad de las enzimas degradantes de las paredes celulares, son importantes a tener en cuenta durante la selección de los agentes de control biológico (Hermosa *et al.*, 2004).

En el presente estudio, al igual que los resultados presentados por Grondona *et al.*, (1997), se verificó la poca variabilidad en las características morfológicas de las cepas *T. harzianum*. No obstante, el tamaño de las esporas (Rifai, 1969) y la presencia y la ubicación de las clamidosporas (Lewis & Papavizas, 1984) fueron utilizadas por estos autores para la caracterización de las cepas de este hongo del suelo.

El crecimiento radial de la colonias, la coloración de las mismas y del medio de cultivo, el tamaño y la forma de los conidios y la presencia y ubicación de las clamidosporas, no presentaron diferencias con las descritas por Rifai (1969), Bisset (1991) y Samuels (2013). Para la especie *T. harzianum*, sin embargo, la presencia o ausencia de las clamidosporas y su ubicación en el micelio, fue lo que presentó mayor variación. La formación de clamidosporas es de gran importancia para la supervivencia del hongo en el suelo ya que le permite superar periodos prolongados en condiciones adversas, siendo esta una característica deseable para los agentes de control biológico (Chet, 1987).

Las tendencias actuales proponen la integración de los atributos fisiológicos y bioquímicos, junto con criterios morfológicos clásicos, para establecer nuevos grupos infraespecíficos en *T. harzianum* que puedan estar relacionados con diferentes niveles

de actividad biológica contra diferentes hongos fitopatógenos (Grondona *et al.*, 1997; Consolo *et al.*, 2012).

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS DE *T. harzianum*

1. Introducción

1.1 Fisiología y relación con las condiciones ambientales

Las especies de *Trichoderma* se encuentran en suelos con abundante materia orgánica (Arias, 2004) y por su relación con ésta, están ubicadas en el grupo de hongos hipogeos, lignolícolas y descomponedores (Baath, 1991). El metabolismo de las especies de *Trichoderma* es muy versátil y diverso (Klein & Eveleigh, 1998; Kubicek-Pranz, 1998). Las fuentes de nitrógeno que pueden utilizar varían, generalmente, desde compuestos de amonio hasta aminoácidos y proteínas, sin embargo la asimilación de nitrato es a menudo muy pobre y depende de la especie. Los sustratos carbonados, por ellos usados, son extremadamente diversos. Las especies de *Trichoderma* son uno de los pocos grupos de organismos que pueden metabolizar el C₁, esto se visualiza en el crecimiento de *Trichoderma lignorum* sobre metanol (Tye & Willetts, 1977). Diversas cepas de *Trichoderma* degradan hidrocarburos. Esta capacidad se ve reflejada en las poblaciones de las mismas que habitan suelos contaminados con petróleo (Davies & Westlake, 1979). *Trichoderma* degrada una gran variedad de polisacáridos como celulosa, quitina, laminarina, pectinas entre otras (Kubicek-Pranz, 1998). Grondona *et al.* (1997) determinó que todas las cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas en su estudio fueron capaces de asimilar etanol y crecer y esporular en ácido láctico como única fuente de carbono. Consolo *et al.* (2012) observó que los aislamientos de *T. koningi* fueron los únicos que esporularon en un medio cuya única fuente de carbono era la lactosa. Esta situación les permitió diferenciarlos de otras especies de *Trichoderma*. A su vez, Grondona *et al.* (1997) observó que la esporulación y la producción de pigmentos difundibles al medio, en pruebas fisiológicas de hidrólisis de gelatina, produjeron la máxima discriminación entre las cepas estudiadas. Es notorio que las especies de *Trichoderma* son capaces de nutrirse diversos sustratos, incluyendo otros hongos. Además poseen la capacidad para competir por los nutrientes y producir antibióticos. Estos hongos, usan estas capacidades interactivas para facilitar su desarrollo en hábitats particulares (Klein & Eveleigh, 1998).

Las temperaturas óptimas de crecimiento de la mayoría de las especies de *Trichoderma* están en un rango de entre 25-30°C. Sin embargo, una gran parte de los aislamientos de este hongo fueron seleccionados inicialmente a temperatura ambiente. Quizá de esta manera se excluyeron así a las formas psicrófilas y termotolerantes, de crecimiento más lento. Indudablemente la temperatura es crítica en la recuperación, tanto cuantitativa, como cualitativa de *Trichoderma* y es determinante, afectando su crecimiento y colonización (Klein & Eveleigh, 1998). Sin embargo, McBeath & Adelman (1991) aislaron una cepa de *Trichoderma* sp en suelo de Alaska, que creció en un amplio rango de temperatura de 4°C a 33°C. Según Martínez *et al.* (2013) la relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma*, depende de la especie y de cada aislamiento. Se conoce que las cepas de *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum* Hamill, toleran de 40 a 41°C; las especies de *T. koningii* y *T. hamatum* crecen hasta los 35° C y *T. viride* y *T. polysporum* resisten 31°C. Para las cepas de *T. harzianum* la temperatura máxima de crecimiento es de 38°C (Danielson & Davey, 1973). La temperatura óptima para el crecimiento, no necesariamente coincide con la optima para lograr su máxima actividad antagónica, y existe estrecha relación entre cada aislamiento, temperatura y antagonismo (Martínez *et al.*, 2013). Rollan *et al.* (1999) determinaron el efecto de la temperatura sobre la capacidad antagónica de las seis especies de *Trichoderma*. Observaron que la mayor colonización de esclerocios fue a 25-30°C y a 20-25°C frente a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii* Curzi, respectivamente. Existe alguna correlación entre la distribución de especies y las condiciones medioambientales. *T. polysporum* y *T. viride* se encuentran en climas frescos, en cambio *T. harzianum* es característico del clima cálido (Klein & Eveleigh, 1998). Sin embargo, en estudio de distribución de población de *T. harzianum* se las ha encontrado en climas templados, templados-fríos e incluso fríos (Chaverri *et al.*, 2003; Paredes *et al.*, 2013). Esto determina que cada especie se correlacione con una temperatura óptima de crecimiento (Klein & Eveleigh, 1998).

Las especies de *Trichoderma* no son exigentes con relación al pH del sustrato. Pueden crecer en suelos con pH desde 5,5 a 8,5 (Besoain, 2005). Papavizas (1985) determinó que el crecimiento máximo de los aislamientos se produjo a valores de pH superiores a 6,5, es decir en un ambiente ligeramente ácido. Consolo *et al.* (2012) observaron el crecimiento de diferentes cepas de *Trichoderma* a pH 2, 10 y 12 y determinaron que ninguno de los aislamientos creció con valores de pH extremos. Lejeune *et al.* (1995) determinaron que en el rango de pH 2,2 a 7,6 no se afectaba la formación de los conidios en la mayoría de las cepas de *Trichoderma*.

Las especies de *Trichoderma* se desarrollan óptimamente en suelos con una humedad del 60% de capacidad de campo. Se le dificulta la colonización y supervivencia en suelos saturados por la baja disponibilidad de oxígeno por (Martínez *et al.*, 2013).

Para incorporar productos biológicos en el manejo de un cultivo, es imprescindible conocer la sensibilidad de los agentes biocontroladores a los agroquímicos. En este aspecto la respuesta de *Trichoderma* varía según las combinaciones especie/cepa de microorganismos y productos fitosanitarios evaluados (Martínez *et al.*, 2013). Las especies de *Trichoderma* se conocen como resistentes a una gran variedad de químicos utilizados para el tratamiento del suelo como son el carbono disulfuro, el captan formalina, el bromuro de metilo, el 2-cloro-4-hidroximercurifenol dependiendo de la concentración del producto (Klein & Eveleigh 1998). Sin embargo, Durán *et al.* (2007) observaron una marcada inhibición del crecimiento micelial de *Trichoderma* frente al fungicida fludioxonil + metalaxil, a una dosis letal media inferior a la recomendada para campo. En pruebas in vitro los fungicidas oxiclورو de cobre, metalaxil y dimetomorf fueron compatibles con diferentes especies de *Trichoderma*, mientras el zineb, el mancozeb y el tiram mostraron ligera toxicidad y el benomil se comportó como tóxico (Muiño *et al.*, 2006). Los fungicidas propiconazol + piroquilon, carbendazim y tebuconazol + triadimenol, en ensayos in vitro, afectaron totalmente el crecimiento de cepas de *T. asperellum*, mientras que la azoxistrobina solo produjo una disminución significativa de la esporulación de las cepas evaluadas (Martínez *et al.*, 2013).

La acción de los insecticidas sobre este agente de control biológico es variable. El dimetoato fue compatible in vitro con *Trichoderma* spp. (Muiño *et al.*, 2006), al igual que el metamidofos. Sin embargo, la cipermetrina y la cihalotrina inhibieron significativamente el crecimiento de *T. asperellum*. No obstante, ninguno afectó la esporulación, ni la germinación de los conidios (Martínez *et al.*, 2013)

Los herbicidas también mostraron diferentes grados de incompatibilidad con aislamientos de *Trichoderma*. Israel *et al.* (2005) observaron que la presencia de diclorán en el suelo afectó la viabilidad de *Trichoderma*. Los herbicidas fenoxaprop-etilo, 2,4D sal de amina y glifosato inhibieron significativamente el crecimiento de dos cepas de *T. asperellum* (Reyes *et al.*, 2009). No obstante, productos de este tipo como la trifluralina + la napropamida y el bispiribac-sódico fueron considerados compatibles con diferentes especies de *Trichoderma* (Muiño *et al.*, 2006). Los herbicidas tienen

ligera influencia en la esporulación de este antagonista y solo 2,4D sal de amina inhibió la germinación de los conidios de *T. asperellum* (Reyes *et al.*, 2009). Las afectaciones de los plaguicidas se observaron además, sobre las características culturales de *T. asperellum*, provocando variaciones en los bordes, en la coloración de las colonias y la textura del micelio. Sin embargo, *Trichoderma* es capaz de degradar compuestos organoclorados, clorofenoles e insecticidas como el dicloro difenil tricloroetano (DDT), el endosulfán, el pentacloronitrobenzeno, el aldrin y el dieldrin y herbicidas como la trifluralina y el glifosato (Espósito & Dasilva, 1998). Se debe evaluar la compatibilidad de cada una de las cepas con los agroquímicos empleados en los escenarios de aplicación. Desde el punto de vista práctico, esto tiene gran importancia para determinar el momento de la incorporación del antagonista en el manejo del cultivo.

Por otra parte, las poblaciones de *Trichoderma* pueden convertirse en dominantes del suelo después de una fumigación (Munnecke, 1972), dependiendo del tipo de producto químico utilizado.

1.2 Mecanismos de *Trichoderma* implicados en el biocontrol de fitopatógenos: Sistema enzimático

Varios mecanismos se han sugerido como responsables para el control de las enfermedades de las plantas por cepas de *Trichoderma*. Uno de estos mecanismos es el micoparasitismo, que implica la acción de diversas enzimas que degradan la pared celular de los hongos (Elad *et al.*, 1982; Chet *et al.*, 1998; Viterbo *et al.*, 2002; Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Hermosa *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2013), entre las cuales se encuentran las quitinasas, β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas y proteasas. Debido a que la quitina y los β -1,3-glucanos son los principales componentes estructurales de las paredes celulares de los hongos, se ha propuesto que las enzimas mencionadas son claves en el micoparasitismo (Elad *et al.*, 1982; de la Cruz *et al.*, 1995; Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004).

Existen otras enzimas que degradan las paredes celulares, incluyendo aquellas que hidrolizan polímeros de menor importancia, como proteínas, β -1,6-glucanos, β -1,3-glucanos y de gran importancia como la celulosa, entre otros compuestos (de la Cruz *et al.*, 1995; Kubicek-Pranz, 1998).

1.2.1 Quitinasas

La quitina es un polisacárido compuesto por unidades de N-acetil- β -D-glucosamina con enlaces β -1,4. Es uno de los polímeros más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Es un componente estructural de las paredes celulares de los hongos; de los nematodos y también forman parte de la cutícula de artrópodos incluyendo crustáceos e insectos (Sahai & Manocha, 1993).

En función de los productos de reacción que se generan en la degradación de la quitina, las quitinasas se clasifican (Sahai & Manocha, 1993) en: (1) endoquitinasas, que cortan aleatoriamente el polímero de quitina dando lugar a una mezcla de oligómeros de distinto tamaño y bajo peso molecular, principalmente, N-acetilglucosamina; (2) exoquitinasas o quitobiosidasas, que liberan dímeros de N-acetil- β -D-glucosamina a partir del extremo no reductor de la quitina y (3) 1,4- β -N-acetil glucosaminidasas, también denominadas hexosaminidasas o quitobiasas, cuyo modo de acción es de tipo exo y cortan el oligómero de quitina dando lugar a monómeros de N-acetil- β -D-glucosamina. Muchas de estas enzimas se han purificado y se han clonado muchos de los genes que las codifican (Viterbo *et al.*, 2002).

Se han encontrado quitinasas en muchas especies de *Trichoderma* (De la Cruz *et al.*, 1995; Consolo *et al.*, 2012). En cepas de *T. harzianum*, donde el sistema quitinolítico se ha estudiado más detalladamente, se han clonado, en diferentes cepas, los genes que codifican algunas quitinasas como CHIT37, CHIT42, CHIT33 y CHIT36 de *T. asperellum* y de *T. harzianum* (Viterbo *et al.*, 2002). Las cepas de *T. harzianum* producen naturalmente sólo cantidades moderadas de endoquitinasa. La sobreexpresión de las endoquitinasas podría generar cepas de biocontrol más eficaces (Margolles-Clark *et al.*, 1996) Por esta razón, Hayes *et al.* (1994) generaron cepas de *T. harzianum* que sobre expresaron el genThEn-42 endoquitinasa.

Inicialmente, el efecto antifúngico de las quitinasas se demostró, en ensayos in vitro, tras observar que su presencia en la mezcla de reacción inhibía el crecimiento o la germinación de las esporas de distintos hongos patógenos (Lorito *et al.*, 1993). La actividad quitinolítica, en las cepas caracterizadas como parasitarias, fue mucho mayor que la de cepas que no eran parasitarias. De esta manera, se relacionaron con el micoparasitismo (García *et al.*, 1994). Como la quitina es el componente más importante de las paredes celulares de una gran parte de las especies fúngicas, a las quitinasas se les ha asignado la función más importante en la actividad

biocontroladora. El sistema quitinolítico en *T. harzianum*, está integrado por seis enzimas distintas: dos del tipo N-acetilglucosaminidasa y cuatro endoquitinasas (Viterbo *et al.*, 2001).

Las cepas transformadas, con la actividad enzimática reducida o sobre-expresada disminuyeron significativamente la actividad de biocontrol o la mejoraron frente a *Rhizoctonia solani* causante de enfermedades de plántulas de algodón (Howell, 2003). Sin embargo, las diferencias no eran tan grandes y probablemente indicaban que otros factores también influían en el trabajo. En un estudio similar, Woo *et al.* (2001) también determinó la actividad de la quitinasa (ech42) en *T. harzianum* (P1) y mostró actividad biocontroladora reducida contra *Botrytis cinerea* en hojas de poroto.

1.2.2 Glucanasas

Las glucanasas agrupan un gran número de enzimas que degradan homopolímeros lineales o ramificados de D-glucosa unidos mediante enlaces α y/o β . Estas enzimas están involucradas en diversas funciones morfogénicas y nutricionales, para la obtención de energía a partir de polímeros de reserva. En las especies de *Trichoderma* se les ha atribuido un papel importante en el micoparasitismo aunque el sistema ha sido menos estudiado que para las quitinasas (Lorito *et al.*, 1996)

Además en el mecanismo de degradación de la pared celular fúngica, está involucrado el sistema β -1,3-glucanasas que pueden hidrolizar el sustrato a partir de dos grupos enzimáticos diferentes: a) exo- β -1,3-glucanasas; b) endo- β -1,3-glucanasas (Monteiro & Ulhoa, 2006).

Las β -1,6-glucanasas degradan polímeros de glucosa unidos mediante enlaces β -1,6, tanto en su modo endo como exo. Se han purificado varias endo- β -1,6-glucanasas de la cepa *T. harzianum* T34 (de la Cruz *et al.*, 1992). Estos trabajos las han relacionado directamente con el micoparasitismo, ya que transformantes que sobre expresen alguno de estos genes, tienen mayor actividad antifúngica frente a hongos patógenos, como *R. solani* o *B. cinerea*, respecto a la cepa.

1.2.3 Proteasas

Las funciones de las proteasas son muchas y de diversa naturaleza. Participan en procesos de morfogénesis, nutrición, metabolismo y procesamiento de proteínas

extracelulares para su activación (Howell, 2003). Una proteasa del subtipo serina inducida por la quitina ya ha sido descrita en una cepa de *T. harzianum* (De la Cruz *et al.*, 1995). La actividad proteolítica de *T. harzianum* es un requisito necesario para la lisis de la matriz de proteínas de la pared celular de los patógenos. Además inactiva las enzimas hidrolíticas secretadas por patógenos, disminuyendo su patogenicidad (Markovich & Kononova, 2003). La PRB1 proteasa alcalina producida por *T. harzianum*, está codificada por el gen PRB1. Este gen se induce cuando el hongo crece en medios que contienen paredes celulares de *R. solani*, de micelio o la quitina como única fuente de carbono. La producción de PRB1 se inhibe por la glucosa (Geremia *et al.*, 1993). La producción de proteasa de *T. harzianum* también se ha asociado con el control biológico del nematodo de raíz *Meloidogyne javanica* en plantas de tomate. Sharon *et al.*, (2001) demostraron que las plantas de tomates tratadas con el agente de biocontrol (T-203), que se cultivaron en suelo infestado con nematodos, mostraron una reducción drástica de los daños en la raíz, en comparación con un testigo sin T-203.

1.3 Objetivos

- Caracterizar fisiológicamente las cepas de *T. harzianum* en base a los siguientes parámetros: crecimiento de las colonias en diferentes fuentes carbonadas. Crecimiento, esporulación y pigmentación de las colonias en presencia de medios de cultivo enriquecidos con aminoácidos y sales orgánicas como fuente nitrogenada. Crecimiento de las colonias y esporulación de conidios bajo condiciones extremas de temperatura y pH.
- Caracterizar la actividad enzimática: se cuantificará la actividad enzimática de los sistemas quitinolítico, β -1,3-glucanasas y proteasas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Caracterización fisiológica

2.1.1 Crecimiento en diferentes temperaturas.

Cada una de las 37 cepas de *T. harzianun* se sembraron en medio Czapek's Agar (Cz-Agar) organizando tres cajas para cada una de ellas. Se incubaron a 4 °C, 37 °C y 40 °C. En el tiempo final del ensayo se evaluó el diámetro de las colonias en centímetros. Se dio por finalizado el ensayo cuando a 37°C la primera cepa cubrió la superficie del medio nutritivo.

2.1.2 Resistencia térmica

Para este estudio, se inoculó una gota de la suspensión de esporas de cada una de las cepas de *T. harzianum*, en 0,5 ml de una solución al 0,2% de Tween 80. Se calentó durante 5 min a 75°C en un baño de agua. Después de 5 minutos la suspensión fue dispersada, con una varilla de vidrio estéril, en las placas con medio de cultivo Cz-Agar. Se sembraron tres cajas para cada una de las cepas. Se incubaron por 7 días en estufa a 26°C. Se evaluó si la cepa tuvo la capacidad de crecer, después de ser sometida a 75°C (Grondona *et al.*, 1997).

2.1.3 Crecimiento a diferente valores de pH

Para determinar la capacidad de crecimiento y esporulación de las 37 cepas en estudios se las cultivo a pH 2, pH 10 y a pH 12. El ensayo se realizó en medio líquido con 0,05 g/L de bromocresol púrpura (el medio de cultivo fue Cz sin agar). Para pH 2 el medio se suplementó con 10,5 g/L de ácido cítrico y se ajustó el pH con una solución 1 M de ácido clorhídrico (Bridge, 1985). Para pH 10 y pH 12 se reemplazó el fosfato biácido de potasio por 3,75 g/L de glicina y 0,2 g/L de fosfato ácido bipotásico y se ajustó el pH con una solución 1 M de hidróxido de sodio. Cada cepa se sembró tres veces para cada una de las condiciones de pH analizadas. Se incubó durante 5 días a 26 °C ± 2 °C en agitación, a una velocidad de 150 rpm. Se evaluó el cambio de color del medio y el crecimiento para cada una de las cepas estudiadas.

2.1.4 Asimilación de fuentes de carbono

Para este estudio, se sembró en el medio Cz líquido sin sacarosa un taco circular de APG de 8 mm cubierto con micelio y esporas de cada una de las cepas en estudio. Previamente, se ajustó el medio a pH 4,5 con solución 1 M de ácido clorhídrico o 1 M de hidróxido de sodio. Las fuentes de carbono ensayadas fueron (10 g/L) de ácido cítrico y lactosa. La lactosa fue esterilizada por microfiltrado. Se utilizó bromocresol púrpura como indicador de pH (0,05 g/L). Se evaluó la capacidad del hongo de crecer en las diferentes fuentes de carbono y/o de virar la coloración del indicador, a los 7 días de incubado a 26 °C ± 2°C en agitación. Se prepararon además, un control negativo que consistió en el medio basal (Cz) sin la fuente de carbono y uno positivo con 30 g de sacarosa. Para cada una de las cepas la siembra se realizó por duplicado al igual que los controles positivo y negativo.

2.1.5 Asimilación de fuentes nitrogenadas

Sobre el medio Cz-agar sin nitrato de sodio a pH 4,5, en posición central, se sembró un bloque de 0,8mm de APG con micelio y esporas de las cepas estudiadas. Las fuentes nitrogenadas que se usaron fueron: oxalato de amonio y glicina, ambos a una concentración de 3 g/L. Se evaluó la capacidad de crecer, el cambio en el color de los conidios y la esporulación con las diferentes fuentes nitrogenadas, a los 7 días de incubadas a 26°C. El control negativo consistió en el medio basal (Cz) sin la fuente de nitrógeno y para el control positivo se incorporaron 2,5 g /L de nitrato de sodio (Bridge, 1985). Para cada una de las cepas la siembra se realizó por duplicado al igual que los controles positivo y negativo.

2.2 Enzimas

2.2.1 Acondicionamiento de los aislamientos

Para generar la producción de proteínas en el medio líquido, se utilizó el medio basal que contenía extracto de levadura 1g/L y peptona 4g/L (González *et al.*, 2012). En cada frasco Falcon de 50 ml con medio basal, se inoculó una suspensión de esporas de *Trichoderma* de 1×10^5 espora/ml. Los frascos se incubaron a 25 °C en agitación constante a 150 rpm durante 48h, luego se centrifugaron. Los filtrados de cultivo se utilizaron para determinar la actividad específica de las siguientes enzimas: proteasas, endoquitinasas y β -1, 3 glucanasas, secretadas al medio.

2.2.2 Actividad β -1, 3 glucanasa

La enzima β -1, 3 glucanasa se ensayó en un volumen de 25 μ L del filtrado enzimático en presencia de 5 μ L de laminarina (Sigma) y en 50 μ M de un buffer de acetato de sodio (pH 5,5). El contenido de la reducción de azúcares se cuantificó por el método de Somogyi Nelson, con 40 μ L de la solución Somogyi A+B y 40 μ L de la solución Nelson, después de 30 minutos de incubación a 37 °C (de la Cruz *et al.*, 1995). Para estos ensayos se utilizaron placas de 96 celdas que fueron sembradas con la mezcla de reacción, organizadas por duplicado (Zheng & Wozniak, 1997). Se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro de Fares Taie. Se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M y 100 μ M. Una unidad de β -1, 3 glucanasa se definió como la cantidad de enzima que puede liberar 1 μ M de glucosa, requerida para producir un aumento de 0,1 unidades de absorbancia en 30 minutos de reacción a 37°C. La actividad de la enzima se expresa en Unidades de actividad por mg de proteína.

2.2.3 Actividad endoquitinasa

La actividad de la endoquitinasa se detectó utilizando el sustrato altamente sensible 4-metilumbeliferil β -D-N, N', N'',-triacetilquitotriosa (Sigma) después de 30 min de incubación a 37 ° C (Baek *et al.*, 1999). La medición de la absorbancia se realizó en un equipo FluorSkan (Thermo) utilizando dos longitudes de onda, la primera de 355nm para excitar y la segunda con la que se midió la fluorescencia del sustrato, de 525nm. A 80 μ l del filtrado, obtenido previamente con cada una de la cepas, se le incorporó 5 μ l del sustrato 4-metilumbeliferil β -D-N, N', N'',-triacetilquitotriosa diluido en un buffer de acetato de sodio (pH 5,5). La medición de la absorbancia se realizó a pH básico con el agregado de carbonato de sodio. Para estos ensayos se utilizaron placas de 96 celdas que fueron sembradas con la mezcla de reacción por duplicado (Zheng & Wozniak, 1997). Se construyó una curva de calibración a partir de las concentraciones conocidas de una solución estándar. Una Unidad de quitinasa es la cantidad de enzima que se libera por cada 1 μ M de 4-metilumbeliferona, por minuto a pH5 y a 37°C. Se expresa en Unidades de actividad por mg de proteína

2.2.4 Actividad de la proteasa

La actividad de esta enzima se determinó en presencia del sustrato sintético N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilida (Sigma) después de 30 min de incubación a 37 °C (St. Leger *et al.*, 1987; Bind-Schedler *et al.*, 2002). Para estos ensayos se utilizaron 40 μ L de filtrado enzimático de cada una de las cepas a analizar y 60 μ l de N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilida. Cada una de las cepas se sembró por duplicado en placas de 96 celdas (Zheng & Wozniak, 1997). El resultado de la reacción se midió a través de la Absorbancia a 405nm en un espectrofotómetro de Fares Taie. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un aumento de 0,1 unidades de absorbancia en 30 minutos de reacción a 37 °C. La actividad de la enzima se expresa en Unidades de actividad por mg de proteína

3 Resultados

3.1 Caracterización fisiológica

3.1.1 Crecimiento en diferentes temperaturas

Las cepas de *T. harzianum* presentaron diferente comportamiento frente a las tres temperaturas ensayadas. Las cepas 26 y 77 fueron las únicas que mostraron la capacidad de crecer cuando se incubaron a 4 °C (Figura 37). Ninguna de las 37 cepas

de *T. harzianum* crecieron cuando se incubaron a 40 °C. Las incubadas a 37°C presentaron mayor variación en el radio de la colonia. Las cepas 8, 80, 83, 93, 131, 140, 141, 160, 170, 172, 182 y 206 no presentaron crecimiento, mientras que el resto de las cepas presentaron colonias de tamaño variables.

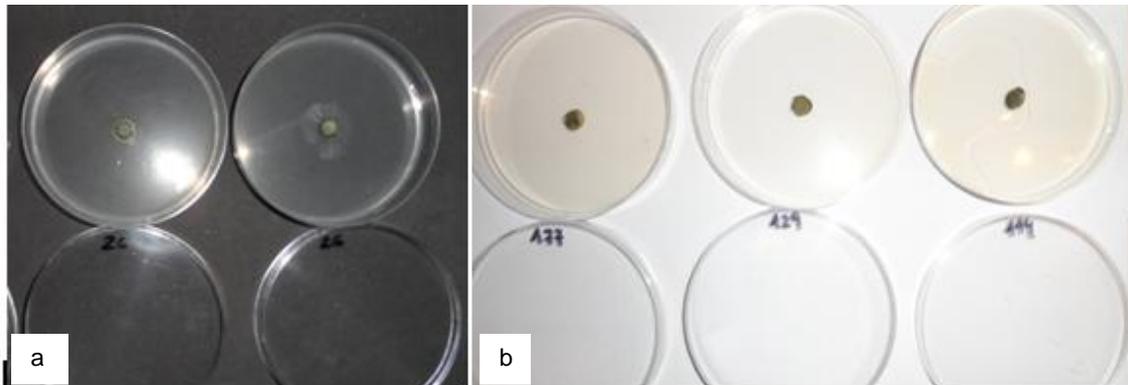


Fig. 37. Ensayo de crecimiento de las cepas de *T. harzianum* a 4 °C. a) crecimiento a 4°C de la cepa 26. b) Reacción de las cepas 177, 129 y 114 sin crecimiento.

3.1.2 Resistencia térmica

Las cepas de *T. harzianum* 2, 12, 73, 80, 141, 160, 170, 177, 181, 206 y 215 no crecieron después que sus conidios se expusieron a 75°C por 5 minutos. El resto de las cepas presentaron crecimiento normal (Figura 38).

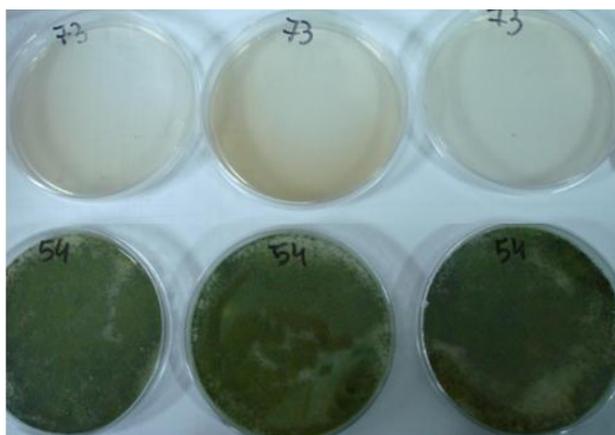


Fig. 38. Crecimientos de las cepas 54 y 73 luego de la exposición de los conidios a 75°C por 5 minutos.

3.1.3 Crecimiento a diferente valores de pH

Bajo ninguno de los pH ensayados las 37 cepas de *T. harzianum* mostraron crecimiento, ni generaron cambios de coloración del medio de cultivo (Figura 39 a, b y c).

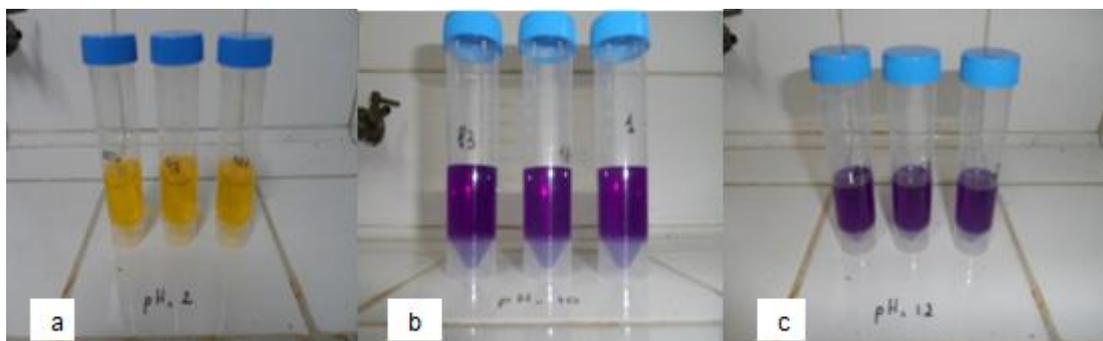


Fig. 39 Ensayo de crecimiento de las cepas a diferentes pH: (a) pH 2, (b) 10, (c) 12.

3.1.4 Asimilación de fuentes de carbono

Se determinó la capacidad de crecimiento y de cambiar el color del medio para cada una de las cepas de *T. harzianum* cuando se utilizaron al ácido cítrico y la lactosa como únicas fuentes de carbono.

Las 37 cepas de *T. harzianum* estudiadas crecieron en medio líquido con ácido cítrico (Figura 40). Solo 14 de las cepas (1, 2, 8, 12, 77, 83, 108, 129, 141, 165, 170, 182, 206, 215) produjeron cambios en la coloración del medio de cultivo.

Se observó que todas las cepas, crecieron en el medio cuya única fuente de carbono fue la lactosa (Figura 41). Por otra parte las cepas 8, 54, 108, 114 y 162 produjeron cambio de color del medio nutritivo.

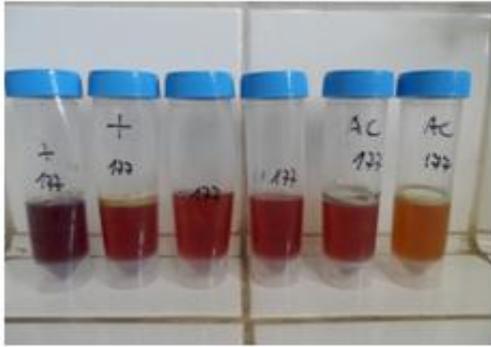


Fig.40 Crecimiento de *T. harzianum* y cambio de coloración en un medio líquido con ácido cítrico



Fig.41 Crecimiento de *T. harzianum* y cambio de coloración en un medio líquido con lactosa

3.1.5 Asimilación de fuentes nitrogenadas

Las 37 cepas de *T. harzianum* presentaron la capacidad de crecer utilizando como única fuente de nitrógeno al oxalato de amonio y la glicina (Figura 42 y 43). Se observó que las cepas 10 y la 210 no esporularon cuando el medio de cultivo con glicina. En el caso del medio de cultivo preparado con oxalato de amonio, todas las cepas esporularon, menos la 210. Dieciocho de estas cepas presentaron un cambio de color del verde al amarillo en sus conidios (Figura 43).

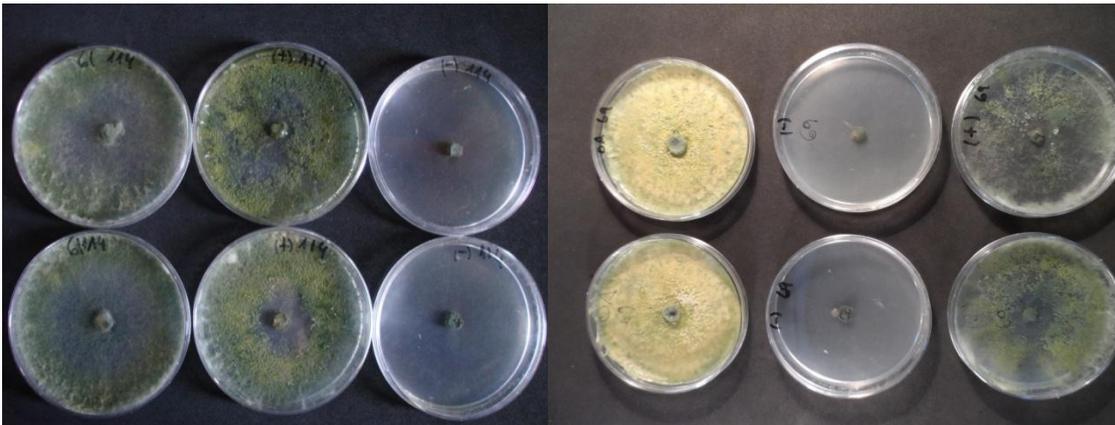


Fig. 42 Crecimiento y esporulación de la cepa 69 de *T. harzianum* en medio con glicina.

Fig. 43 Crecimiento y esporulación de la cepa 69 de *T. harzianum* en medio con oxalato de amonio.

3.2 Actividad enzimática

3.2.1 Actividad β -1, 3 glucanasa

Analizando los resultados obtenidos de la actividad específica para β -1,3 glucanasa, en la Figura 44 se observa que la cepa 83 es la que se destacó por la producción de esta enzima, en comparación con el resto. Sin embargo las cepas 1, 5, 8 y 108 presentan valores elevados. También se observó que varias cepas no presentaron actividad para esta enzima.

La Figura 45 muestra la cuantificación colorimétrica de los diferentes niveles de degradación de los azúcares, producidos por las diferentes cepas de *T. harzianum* y las distintas concentraciones de glucosas, que se utilizaron para la elaboración de la curva de calibración.

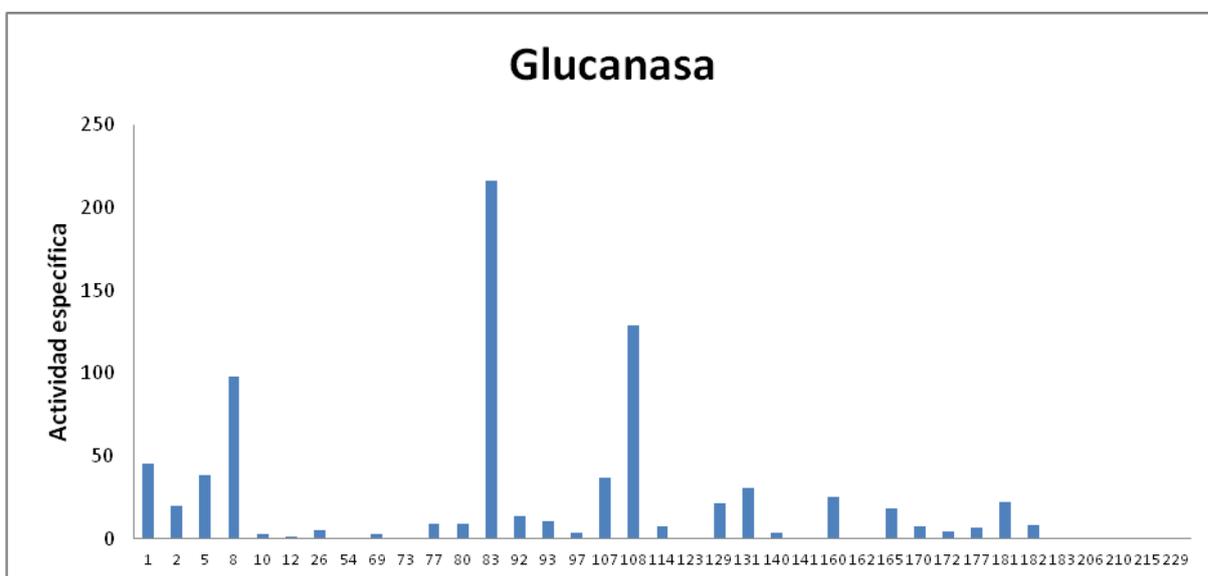


Fig. 44 Actividad específica para la β -1, 3 glucanasa de las 37 cepas de *T. harzianum*.



Fig. 45 Cambios de coloración generada por la enzima β -1, 3 glucanasa para cada cepa de *T. harzianum*. Las celdas G-3 a G8 y H3 a H8 muestran las diferentes concentraciones de glucosa (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M y 100 μ M)

3.2.2 Actividad endoquitinasa

Los resultados, obtenidos a partir de todas las cepas estudiadas con esta enzima revelaron que a diferencia de la actividad de la β -1, 3 glucanasa, los valores se mantuvieron muy uniformes entre las diferentes cepas y en valores menores a 10. Sin embargo, se observó que la cepa 8 se destacó por la alta actividad de la endoquitinasa (Figura 46). En orden de importancia, las cepas 2 y 141 se diferenciaron del resto de las cepas.

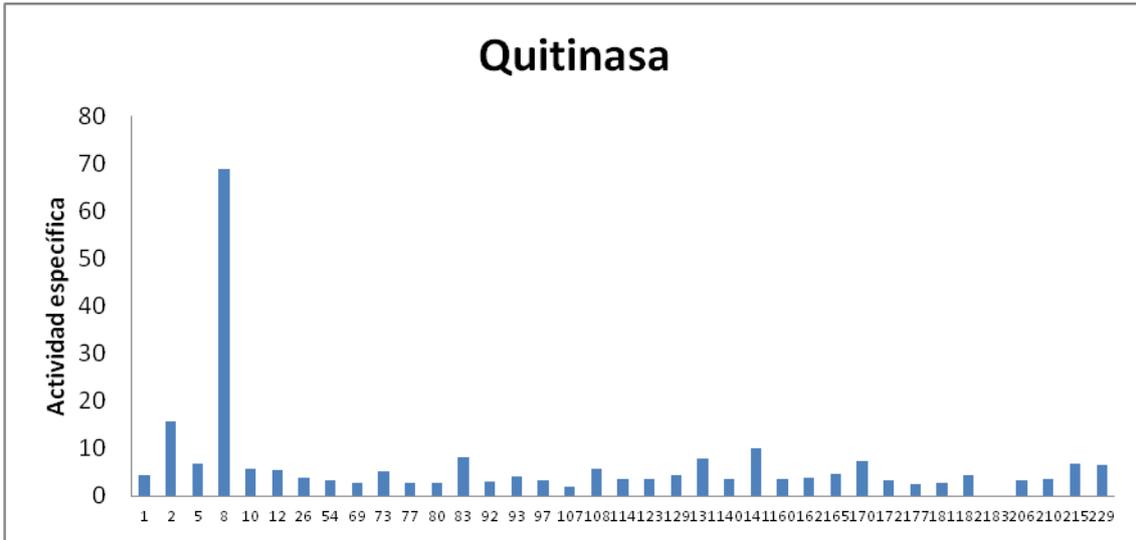


Fig. 46 Actividad específica para la endoquitinasa de las 37 cepas de *T. harzianum*.

3.2.3 Actividad de la proteasa

En la Figura 47 se observan los valores de actividad de la proteasa. Se destacaron las cepas las 2, 8 y 123 por poseer una actividad mayor a 20 U/ mg son. Las cepas 10, 12, 26, 141 y 229 produjeron valores menores de actividad que fluctuaron entre 14 a 18 U/mg.

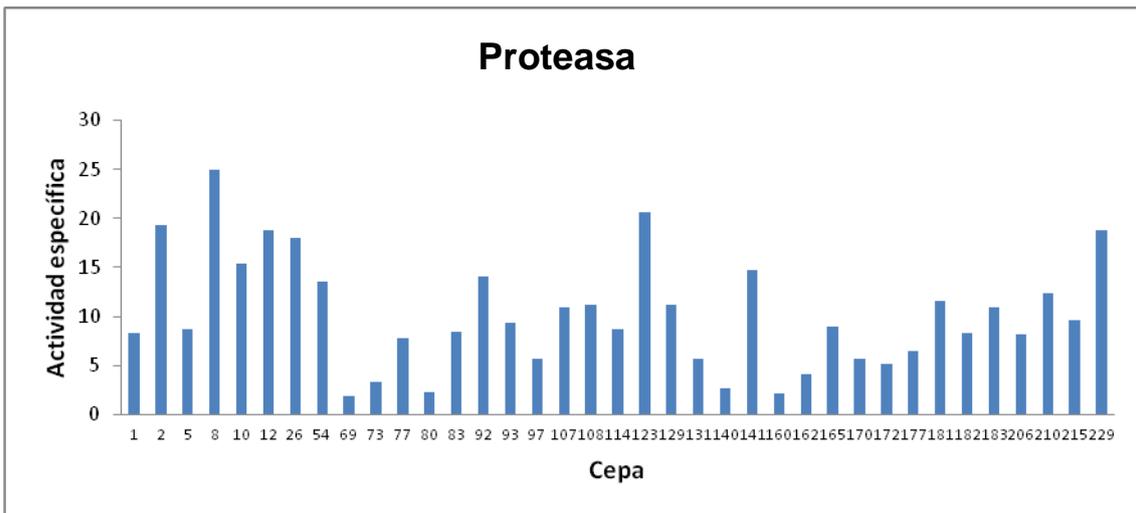


Fig.47 Actividad específica para la proteasa de las 37 cepas de *T. harzianum*

La Figura 48 representa la combinación de las actividades de las tres enzimas (β -1, 3 glucanasa, endoquitinasa y proteasa). Se destacó la cepa 8 por presentar niveles elevados de actividad 98,68 y 25 U/mg para la β -1, 3 glucanasa, la endoquitinasa y la proteasa, respectivamente. En menor medida la cepa 2 con 20, 15, 19 U/mg para la β -1, 3 glucanasa, la endoquitinasa y de proteasa, respectivamente.

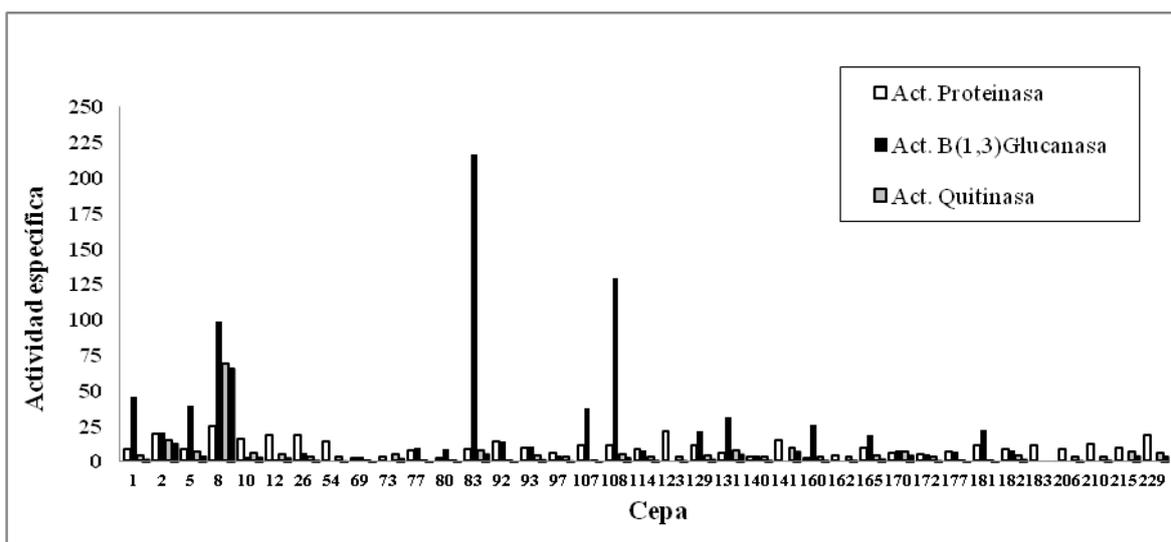


Fig. 48 Actividad conjunta para las tres enzimas para las 37 cepas *T. harzianum*

4. Discusión

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, esto se le atribuye a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1982). En el presente estudio observó que ninguna de las 37 cepas de *T. harzianum* crecieron a 40°C y que algunas de las cepas lo hicieron después de ser expuestas a 75°C por 5 min, resultados coincidentes con los obtenidos por Consolo *et al.* (2012). Las cepas 26 y 77 crecieron a 4°C contrariamente a lo observado por el mismo autor. Con respecto al crecimiento a 37 °C y de acuerdo a lo publicado por Consolo *et al.* (2012) la mitad de las cepas de *T. harzianum*, crecieron a esa temperatura. Además el comportamiento de las cepas estudiadas se acerca a los resultados de Danielson &

Davey (1973) con una temperatura máxima de crecimiento de 38°C. Sin embargo, Martínez *et al.* (2013) determinó la estrecha relación entre cada cepa de *Trichoderma*, la temperatura y antagonismo, por lo tanto la temperatura óptima para el crecimiento, no necesariamente coincide con la óptima para lograr de su máxima actividad antagónica.

Al igual que en este estudio, Consolo *et al.* (2012) no observaron crecimiento de las diferentes cepas de *Trichoderma* a pH 2, 10 y 12. Por lo tanto, en ambos estudios se determinó que ninguno de los aislamientos creció con valores de pH extremos. Se debe tener en cuenta que todos los aislamientos de *T. harzianum* de éste estudio, se obtuvieron de los suelos de la región triguera argentina, caracterizados por ser levemente ácidos.

Tal como se observa en los resultados de caracterización fisiológica de las 37 cepas, todas presentaron la capacidad de crecer en medios nutritivos con fuentes carbonadas como ácido cítrico y lactosa. Solo produjeron cambios en la coloración del medio 14 de las cepas con ácido cítrico y 5 con lactosa. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Consolo *et al.* (2012) donde todas las cepas de su estudio desarrollaron en los medios con diferentes fuentes de carbono y sólo nueve aislamientos produjeron pigmentos naranjas en un medio que contenía ácido cítrico, glucosa o etanol. Estudios semejantes, realizados por Grondona *et al.* (1997) revelaron que todas las cepas utilizadas asimilaron etanol y crecieron y esporularon en ácido láctico como la única fuente de carbono. Contrariamente Manczinger & Polner (1987) precisó que varias especies de *Trichoderma* no fueron capaces de asimilar diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, estas diferencias se explicaron por las condiciones diferentes de los ensayos (pH entre 5-6, y 30 °C temperatura, entre otras) y por la variabilidad existente dentro de la especie *T. harzianum*. Kubicek *et al.* (2003) mostraron la alta capacidad de *T. harzianum* para asimilar diferentes fuentes de carbono, que no se muestra en otras especies de *Trichoderma*. Esta alta variabilidad puede explicarse por qué *T. harzianum* es la especie más abundante de *Trichoderma* y se encuentra en casi todos los hábitats (Kullnig *et al.*, 2000).

En relación a las fuentes nitrogenadas los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas crecieron el oxalato de amonio y glicina. Con el medio con oxalato de amonio sólo una cepa no generó conidios y dieciocho de las cepas presentaron un cambio de coloración de los mismos. Con el medio que contenía como fuente nitrogenada glicina, sólo dos de las cepas no esporularon. Consolo *et al.* (2012)

observaron un crecimiento muy pobre o poca esporulación con todos los aislamientos de *Trichoderma* en los ensayos con las diferentes fuentes nitrogenadas. Bridge (1985) demostró que los medios preparados con las sales de amonio, glicina o urea, generaron un aumento del pH del mismo, que pudo ser causado por la acumulación de amoníaco. En estas condiciones los hongos pueden sufrir autólisis generadas por los compuestos de amonio y por lo tanto, algunas cepas presentaron crecimiento pobre o no crecieron.

Por otra parte, evaluar la compatibilidad de cada una de las cepas con los agroquímicos empleados en el control de plagas, malezas y enfermedades, es importante desde el punto de vista práctico para determinar el momento de la incorporación del antagonista en el manejo de un cultivo.

En este estudio se destacaron las dos cepas (2 y 8), por producir niveles altos de β -1-3 glucanasa, quitinasa y proteasa. La acción reconocida como micoparasitismo para las especies de *Trichoderma* se la atribuyó principalmente a la actividad lítica de las enzimas β -1,3-Glucanasa y quitinasa. El micoparasitismo se ha propuesto como el principal mecanismo que explica la actividad antagonista de *Trichoderma* frente a los hongos fitopatógenos (Howell, 2003; Woo *et al.*, 2006; de la Cruz, 1995). Al igual que en nuestro estudio, Consolo *et al.* (2012) demostró que *Trichoderma* spp. produjo celulasa, β -1-3 glucanasa, quitinasa, enzimas hidrolasas y extracelulares, que están implicadas en la degradación de glucanos de las paredes de los patógenos de las plantas. La difusión de esta enzima cataliza la liberación de oligómeros de la pared celular de los hongos patógenos, y esto a su vez induce la expresión de endoquitinasas, que también pueden difundir y comenzar el ataque contra el hongo blanco, antes del contacto (Viterbo *et al.*, 2002; López Mondéjar *et al.*, 2011)

Además, es importante resaltar que la cepa 8 posee un nivel muy alto de quitinasa. Este efecto se encuentra asociado a una actividad antifúngica, determinada en estudios previos con esta enzima. Lorito *et al.* (1993) demostró, que en ensayos “in vitro”, tras observar que existía la presencia de estas enzimas en la mezcla de reacción, se inhibía el crecimiento o la germinación de las esporas de distintos hongos patógenos. Cabe destacar, que en los últimos años ha sido de gran importancia la búsqueda de las quitinasas extracelulares en las cepas micoparasítica de *T. harzianum*, y el rol más importante es el de la 42-kDa (CHIT 42) para el micoparasitismo (de la Cruz, 1995).

Estos altos niveles de β -1-3 glucanasa, quitinasa y proteasa deberán ser correlacionadas con la agresividad de cada una de las diferentes cepas *T. harzianum* en enfrentamientos in vitro con *S. tritici*. Resultados promisorios fueron presentados por Walker (2010) donde 2 cepas de *T. harzianum* (Th5 y Th118) inhibieron a las 24 h un 62% y un 51% la germinación de los conidios de *S. tritici* mientras que a las 48 h la inhibición fue de un 79% y un 72%, respectivamente. A su vez, el examen microscópico del micelio de *S. tritici*, en presencia de ambas cepas de *T. harzianum* mostro diferencias en la morfologías hifal del patógeno entre los tratamientos y el control. Se observó vacuolización de la hifa con plasmólisis del micelio y aspecto toruloso generado por acción enzimática.

Por último es importante resaltar, que la integración de los atributos fisiológicos y bioquímicos, junto con criterios morfológicos clásicos, ha servido para establecer nuevos grupos infraespecíficas en *T. harzianum* que pudieron estar relacionados con diferentes niveles de actividad biológica contra diferentes hongos fitopatógenos (Grondona *et al.*, 1997; Consolo *et al.*, 2012).

CAPITULO V

INTEGRACIÓN DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES

1. Introducción

Las especies de *Trichoderma* pueden actuar como agentes de control biológico a través de diferentes mecanismos sinérgicos. Sin embargo, es difícil predecir el grado de sinergismo y el comportamiento de un antagonista en un patosistema natural (Sharma *et al.*, 2009). La identificación exacta de las cepas a nivel de especie es el primer paso en la utilización de todo el potencial de los hongos en aplicaciones específicas (Lieckfeldt *et al.*, 1999). Dada la variabilidad dentro de *Trichoderma*, es difícil de usar los nombres asignados por Rifai (1969) o Bisset (1991) para los agentes de control biológico, ya que estos nombres implican conceptos de especie que son demasiado amplios para situaciones prácticas. Una cepa particular de *T. harzianum* puede ser un agente de control biológico bueno o malo, dependiendo del objetivo pretendido y de las funciones requeridas. Por lo tanto, será necesario seleccionar la cepa más eficiente para cada patosistema (Sharma *et al.*, 2009).

El conocimiento sobre el comportamiento de *Trichoderma* como antagonista no es lo único esencial para su uso eficaz como biocontrolador, si no también hay una necesidad de caracterizar con mayor precisión a cada aislamiento. Varios intentos de evaluar la diversidad genética se han realizado para la caracterización y la agrupación de las cepas, incluyendo el análisis de isoenzimas, reacción en cadena de la polimerasa con la técnicas de RAPD y el uso de UP-PCR (Stasz *et al.*, 1989; Zimand *et al.*, 1994; Kuhls *et al.*, 1995; Leuchtmann *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1997; Bulat *et al.*, 1998). Otro método que se ha utilizado para evaluar la variabilidad dentro de las especies y entre las diferentes especies de hongos, es la técnica de ISSR (Consolo *et al.*, 2012). Esta caracterización molecular de las cepas estudiadas definirá su perfil genético, permitiendo seguir su evolución en el tiempo y en el medio ambiente para ampliar la red de trabajos a nivel comercial y aplicado. Sharma *et al.*, (2009) con el fin de caracterizar a una población de cepas de *T. harzianum* obtenidas de la India, utilizaron características bioquímicas y genotípicas; de esta manera lograron diferenciar a las cepas por su producción de enzima y potencial antagonista.

Por su parte, Grondona *et al.* (1997) integraron en su estudio, atributos fisiológicos y bioquímicos, junto con criterios morfológicos clásicos, para establecer nuevos grupos infraespecíficos en *T. harzianum* que puedan estar relacionados con

diferentes niveles de actividad biológica contra diferentes hongos fitopatógenos. Posteriormente Hermosa *et al.* (2004) caracterizaron, esas cepas a través de la diversidad genética de las mismas. Estudios similares fueron realizados por Consolo *et al.* (2012) donde se caracterizó un grupo de aislamientos de *Trichoderma* de diferentes regiones de la Provincia de Buenos Aires, en Argentina, a través de características bioquímicas y molecular, junto con criterios morfológicos clásicos.

2. Materiales y métodos

2.1 Análisis de datos

Se integraron los datos de los diferentes ensayos morfológicos (Capítulo III), fisiológicos y bioquímicos (Capítulo IV) y moleculares (Capítulo II) de las 37 cepas de *T. harzianum*. Se elaboraron dos dendrogramas, uno relacionando los atributos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, utilizando 14 de las variables cualitativas y 6 de las variables cuantitativas (morfológicas, fisiológicas y bioquímicas) y en otro se le incluyó las variables moleculares. Se realizaron los análisis mediante los programas Excel 8.0 y el Software R

2.2 Generación de la matriz básica de datos

Se construyó una base de datos de 37 filas (cepas) y 20 columnas (variables analizadas). La matriz binaria básica de datos fue construida en forma de tabla con el programa EXCEL 8.0. Las filas, correspondieron a los aislamientos de *T. harzianum* y las columnas, correspondieron a las variables (cualitativas y cuantitativas). Para las variables cualitativas los datos fueron convertidos en binarios de la siguiente manera: se le asignó el valor de (+) si estaba presente en cada aislamiento y a la ausencia el valor (-).

2.3 Relación entre los los aislamientos: Obtención de la matriz de disimilitud y la generación de los dendrogramas

Para determinar la relación entre las características fisiológicas, morfológicas bioquímicas y moleculares con los aislamientos, se construyó una matriz de disimilitud, utilizando el coeficiente de Gower (1971). La expresión de la fórmula Gower es la siguiente:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}$$

donde:

S_{ij} = similaridad entre la i -ésima y j -ésima unidad

p = número de variables

w_{ijk} = ponderación para la k -ésima variable entre la i -ésima y j -ésima unidad

Este coeficiente permite el tratamiento simultáneo de variables cualitativas y cuantitativas. A partir de los datos generados se construyó un dendrograma por el método de agrupamiento UPGMA (agrupamiento promedio no ponderado de las medias aritméticas) (Sneath & Sokal, 1973) que define la distancia entre dos grupos o conglomerados como el promedio de todas las distancias de a pares entre elementos de un grupo y elementos del otro grupo y que permite visualizar la relación en grados de similitud entre los aislamientos analizados.

2.4 Generación de la matriz cofenética

Dado que las técnicas que se utilizan para la construcción de los dendrogramas no reflejan en forma exacta la información de la matriz de similitud, (ya que pueden producirse distorsiones de las relaciones de las mismas al realizar una representación bidimensional), el coeficiente de correlación cofenético, mide la correlación entre las interdistancias en el dendrograma y las interdistancias en la matriz de distancia sobre la que se aplicó el procedimiento. Para tener una medida de la distorsión producida en el dendrograma, se construyó la matriz cofenética a partir de la información del mismo y se correlacionó con la matriz de similitud original, utilizando el test de correspondencia de matrices de Mantel (Sokal & Rohlf, 1995). Por lo tanto la fiabilidad del dendrograma fue establecida mediante el cálculo del coeficiente de correlación cofenética (CCR) y realizando 10.000 permutaciones aleatorias.

2.5 Medida de confianza por re-muestreo o Bootstrapping

Bootstrap (Efron, 1979) es un método numérico de re-muestro que en estudios de variabilidad, proporciona una estimación empírica de los parámetros a analizar y de los errores estándares necesarios para construir un intervalo de confianza. Este análisis crea una matriz de datos cuyas columnas se van cambiando de forma aleatoria, e incluso se repiten en una misma matriz, y de cada una de las matrices resultantes crea un árbol filogenético, contando al final en cuántos de ellos aparece el clado a estudiar. Este proceso se repite varias veces (10.000 repeticiones) y finalmente se indica el porcentaje de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices remuestreadas (Yap & Nelson, 1996). Por último todos estos árboles se representan en uno, donde aparecen los porcentajes de la proporción de cada réplica. Los valores de bootstrap, representan la fiabilidad y robustez del dendrograma.

3. Resultado

3.1 Integración de atributos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos

Los aislamientos fueron agrupados en cuatro grupos con una similitud entre ellos del 40%. Estos grupos están integrados por: el grupo I por 17 aislamientos (5, 10, 26, 54, 69, 92, 97, 107, 114, 123, 129, 172, 181, 182, 183, 210 y 229) el grupo II por 8 aislamientos (73, 80, 83, 93, 140, 160, 162, y 177), el grupo III por dos aislamientos (8 y 108) y el grupo IV por 6 aislamientos (1, 2, 12, 77, 131 y 141) (Figura 49).

Las cepas de cada grupo, no presentaron relación con su capacidad biocontroladora, el origen geográfico o el año de aislamiento.

Las cepas que integran el grupo I se caracterizaron porque la mayoría generaron clamidosporas; más del 50 % poseían conidios de tamaño mediano a grande. Estas cepas presentaron crecimiento nulo o el radio de la colonia fue menor a 4 cm cuando se las incubó a 37°C. La mayoría crecieron después de exponerse por 5 min a 75°C. Una gran parte de las cepas pudo crecer sin fuentes carbonadas y además cambiaron la coloración del medio que contenía lactosa y ácido cítrico. Para los ensayos de fuentes nitrogenadas se observó que más del 90% de las cepas no generaron conidios en el medio sin nitrógenos. La mayoría de las cepas esporularon en los medios enriquecidos con glicina y oxalato de amonio. Los conidios de la mitad de las cepas cambiaron su coloración de verde a amarillo en medio con oxalato de amonio. Con respecto a la actividad enzimática, se caracterizaron por: una actividad

baja a nula de la β 1, 3 glucanasa y de la endoquitinasa y una actividad media a alta de proteasa.

Todas las cepas del grupo II fueron capaces de generar clamidosporas. Poseían conidios que variaron entre mediano a chicos. Ninguna de las cepas creció a 4°C, ni fueron capaces de hacerlo a 37 °C. La mitad de las cepas crecieron después de ser expuestas a 75°C por 5 min. Todas crecieron sin fuentes carbonadas y la mayoría cambió el color de los medios enriquecidos con ácido cítrico y lactosa. El 75 % de las cepas cambió el color de sus conidios en el medio con oxalato de amonio. Todas las cepas esporularon con oxalato de amonio y glicina. La mayoría de las cepas no generó conidios sin fuentes nitrogenadas. Las cepas se caracterizaron por: una baja actividad endoquitinasa; una media a baja actividad de la proteasa y una actividad β 1, 3 glucanasa variada (el 62,5% de las cepas tuvo baja actividad, el 25% actividad nula y el resto elevada).

Las cepas que integran el grupo III no produjeron clamidosporas y poseían conidios medianos. No crecieron a 4°C y a 37 °C crecieron menos de 4 cm. Todas las cepas resistieron la exposición a 75 °C por 5 min. Además, desarrollaron en los medios sin fuentes carbonadas. Cambiaron el color del medio con lactosa y ácido cítrico. Ambas cepas esporularon en presencia de oxalato de amonio y de glicina. El color de los conidios de las cepas cambió de verde a amarillo en el medio con oxalato de amonio. Las cepas se caracterizaron por una actividad media de β 1,3 glucanasa; media a elevada de endoquitinasa y proteasa.

Por último para el grupo IV, la mayoría de las cepas se caracterizaron por poseer conidios medianos a grandes. El 80% de las cepas generaron clamidosporas y no crecieron a 4°C. La mayoría de las cepas presentaron crecimiento nulo a bajo a 37°C. La mitad de ellas no crecieron después de ser expuestas por 75°C a 5 min. Todas las cepas crecieron sin ácido cítrico y sin lactosa. El 90% cambió el color del medio en presencia de ácido cítrico, pero ninguna de las cepas cambió la coloración del medio con lactosa. Todas las cepas esporularon con oxalato de amonio y glicina. La mitad de las cepas cambiaron la coloración de los conidios en presencia de oxalato de amonio. La actividad enzimática se caracterizó por ser: nula a baja con la β 1, 3 glucanasa; baja con la endoquitinasa y media a alta con la proteasa.

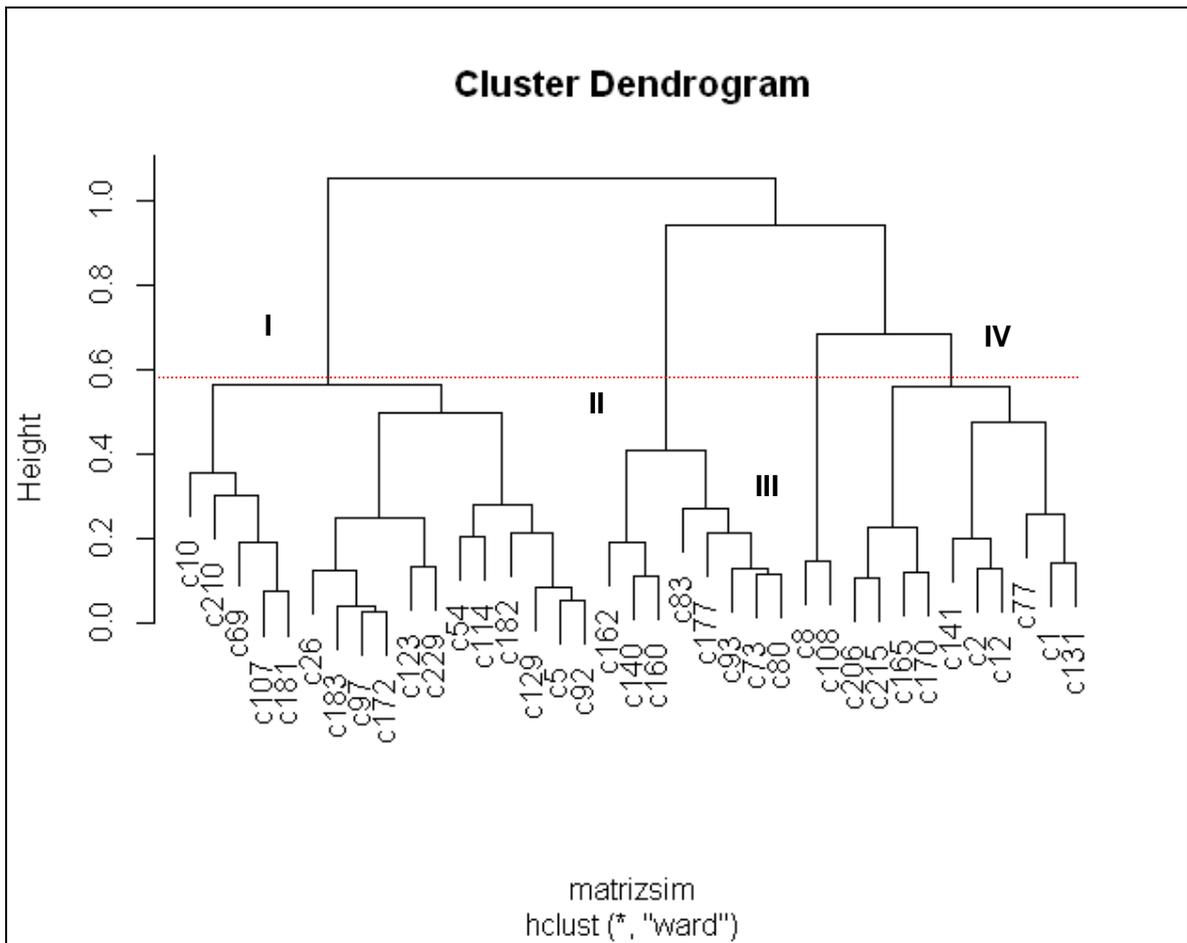


Fig. 49 Dendrograma UPGMA representando los 37 aislamientos de *T. harzianum*. Las variables cualitativas binarias se consideraron como simétricas.

3.2 Integración de los atributos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares

El coeficiente de correlación cofenética calculado fue de 71% y los valores de bootstrapping variaron entre el 65 y el 100%, según el agrupamiento (Figura 50). Dentro de esta figura los números en colores rojo y verde indican valores de probabilidad que se obtienen del presente análisis. Los valores de color rojo son los de mayor confiabilidad. La variación de los valores de bootstrapping entre el 65 y el 100% indican que el dendrograma generado es una buena representación de la relación entre las cepas y las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

La integración de todos los caracteres estudiados determinó que los aislamientos fueran agrupados en cuatro grupos, con una similitud del 60% entre ellos. Estos grupos están integrados por: el grupo I con 10 aislamientos (1, 5, 8, 12, 141,

160, 162, 165, 170, y 177); el grupo II con 6 aislamientos (181, 182, 183, 206, 215 y 229), el grupo III con 7 aislamientos (93, 97, 107, 108, 114, 123 y 129) y el grupo IV con 14 aislamientos (2, 10, 26, 54, 69, 73, 77, 80, 83, 92, 131, 140, 172 y 210) (Figura 50).

Las cepas que integran el grupo I se encuentran divididas en dos ramas bien diferenciadas. Las cepas de la izquierda pertenecen a la localidad de Los Hornos y las de la derecha a la Localidad de Lobería. Esta división en dos ramas estaría indicando que existe una relación de las cepas con el lugar geográfico de donde fueron aisladas.

Todas las cepas que forman el grupo II se relacionaron con el año en que se realizaron los aislamientos. Estas fueron ensayadas durante el 2011. Cuatro de las cepas pertenecen a la localidad de Pergamino y dos a la localidad de Santa Fe.

El grupo III está integrado por 5 cepas de Paraná y 2 de Manfredi. Existe una estrecha relación entre las cepas 114, 93 y 107 que pertenecen a Paraná.

La relación filogenética con el lugar de origen, para el grupo IV es más variable, por estar integrado con una gran cantidad de cepas. Pero analizando pequeños grupos podemos observar que las cepas de Los Hornos se encuentran todas muy cercanas entre si, al igual que ocurre con las cepas 73, 80 y 83 de Bordenave.

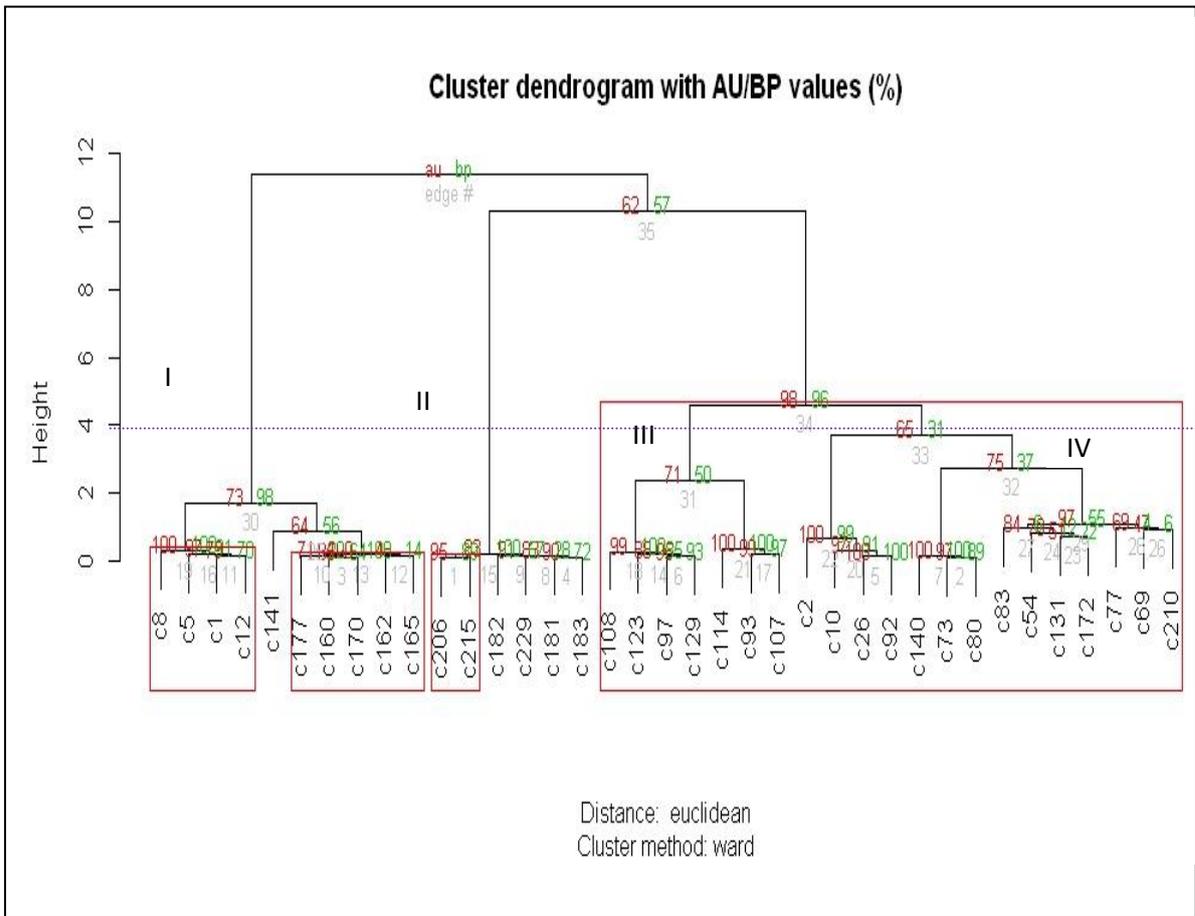


Fig. 50 Dendrograma UPGMA representando los 37 aislamientos de *T. harzianum*. Las variables cualitativas binarias se consideraron como simétricas.

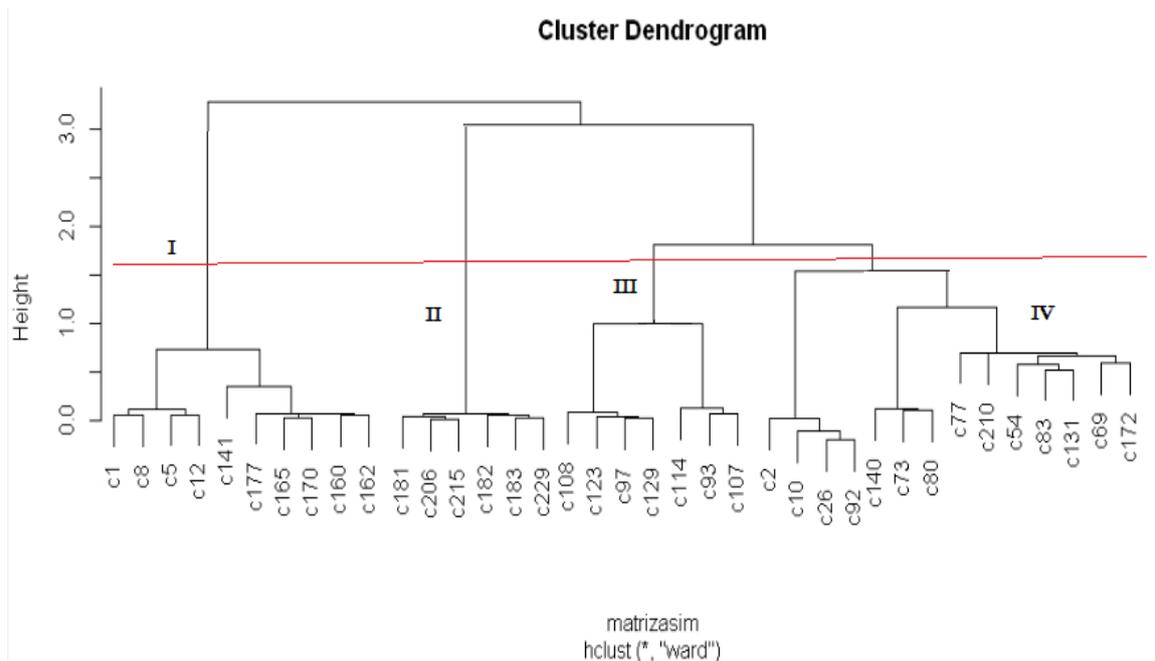


Fig. 51 Dendrograma UPGMA representando los 37 aislamientos de *T harzianum*

4. Discusión integradora

Las bondades que presentan las cepas del antagonista *Trichoderma*, han hecho posible la elaboración de productos biológicos con características amigables con el ambiente. El éxito de estos productos, está amparado por una precisa selección de cepas, tanto desde el punto de vista fisiológico, como por su capacidad biocontroladora y por un estricto sistema de calidad para su producción (Martinez *et al.*, 2013).

En el presente estudio, al igual que en los trabajos realizados por Grondona *et al.* (1997) y Consolo *et al.* (2012) la integración de las atributos morfológicos, fisiológicos, de actividad enzimática y molecular determinaron la existencia de grupos funcionales distintos, dentro de *T. harzianum*. A diferencia de lo mencionado por Consolo *et al.* (2012), en este trabajo no se encontró correlación entre la actividad biológica de las cepas y los mencionados atributos.

Las hipótesis planteadas para este proyecto también se utilizaron para organizar el eje conductor de esta discusión.

En relación a la siguiente afirmación: “La integración de los atributos fisiológicos y bioquímicos junto con los criterios morfológicos clásicos, sirve para establecer nuevos grupos infraespecíficos. “

En este estudio, relacionando las propiedades fisiológicas, bioquímicas con la morfología clásica, se generaron cuatro grupos infraespecíficos. Atributos como: la capacidad de formar clamidosporas, el tamaño de los conidio, el crecimiento a 37°C, la resistencia térmica, el cambio de coloración en medios enriquecidos con oxalato de amonio y la actividad enzimática, se utilizaron para caracterizar las cepas de *T. harzianum* de difícil identificación específica, que para este caso habían sido seleccionadas por su capacidad biocontroladora frente a *S. tritici*. Grondona *et al.* (1997) observó que la hidrólisis de la gelatina, la esporulación y la producción de un pigmento naranja difusible al medio con gelatina, fueron los ensayos que produjeron la máxima discriminación entre las cepas estudiadas. Por su parte, Consolo *et al.* (2012) pudieron distinguir especies de *Trichoderma* entre los aislamientos estudiados por la esporulación en medio con lactosa. Solo las cepas de *T. koningii* fueron capaces de esporular en este medio. Por otra parte, la taxonomía tradicional, basada únicamente en las características morfológicas del hongo, encuentra dificultad, ya que el género *Trichoderma* posee un estrecho rango de variación en la morfología (Samuel, 2006). En consecuencia, Kubicek *et al.* (2003), utilizando la información de secuencia de nucleótidos (ITS1 y ITS2), con los caracteres metabólicos en combinación con las observaciones morfológicas, revelaron que el enfoque “integrador” tiene un mérito considerable en la determinación de las especies, aunque los datos fenotípicos (morfológicos y fisiológicos) pueden no reflejar con precisión las relaciones filogenéticas. Estos antecedentes reafirman la necesidad de integrar los atributos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos para establecer nuevos grupos infraespecíficos.

Con respecto a: “Las diferencias entre los grupos infraespecíficos que se correlacionan con diferentes niveles de actividad biocontroladora sobre la mancha de la hoja del trigo.”

En el presente estudio no se relacionó la variación entre las cepas de *T. harzianum* y sus diferentes comportamientos antagónicos cuando se integraron todos los atributos (morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares). Es importante resaltar que en el presente trabajo se parte de cepas que previamente fueron seleccionadas por su buena capacidad biocontroladora frente a *S. tritici*.

Contrariamente, Kumar & Sharma (2011) encontraron relación entre la agresividad de las cepas y los resultados obtenidos al utilizar distintos tipos de marcadores moleculares (ISSR y RAPD) y morfológicos. A su vez, Grondona *et al.* (1997), determinaron que una cepa particular de *T. harzianum* puede ser un agente de control biológico bueno o malo, dependiendo del objetivo pretendido y las funciones requeridas. Por lo tanto, será necesario seleccionar la cepa más eficiente para cada patosistema individual.

Relacionado con: “Las características morfológicas estudiadas varían dentro de los rangos aceptados por la taxonomía clásica, aunque por sí solas no permiten la diferenciación en grupos dentro de la especie.”

Según los resultados de este trabajo, el crecimiento radial y el color de las colonias, la coloración del medio de cultivo y el tamaño y la forma de los conidios no presentaron diferencias con las descritas por Rifai (1969) y por Bisset (1991) para la especie *T. harzianum*. En este estudio, esas características están dentro de los rangos aceptados por la taxonomía clásica. Al igual que con Grondona *et al.* (1997), se encontró poca variabilidad en las características morfológicas que permita diferenciar los grupos infraespecíficos, a partir de los cultivos monospóricos de *T. harzianum*. Tal como lo afirmaran Rifai (1969) y Lewis & Papavizas (1984) el tamaño de las esporas y la presencia y la ubicación de las clamidosporas permitieron en este trabajo contribuir a la caracterización de estas cepas. Grondona *et al.* (1997) destacaron la estabilidad fenotípica en los cultivos monospóricos de una cepa de *Trichoderma*. Esta observación difirió de la variación morfológica (la textura y la pigmentación de las colonias) observada en las diferentes líneas de monospóricos de *Penicillium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Phoma* spp.

En relación a que: “Las cepas de *T. harzianum*, provenientes de diferentes áreas trigueras, se caracterizan por la heterogeneidad en sus patrones genéticos, demostrando la naturaleza genética de su variabilidad.”

Los marcadores de ISSR discriminaron la variación genética molecular entre las 37 cepas de *T. harzianum*. Así fue posible definir 19 haplotipos agrupados en cuatro clados, con una similitud entre los grupos del 50%, demostrando una alta variabilidad. Estos resultados coinciden con los publicados por Sharma *et al.* (2009) que obtuvieron un coeficiente de similitud del 30% con una muy alta variabilidad entre los aislamientos. La mayoría de los estudios moleculares realizados sobre el género *Trichoderma* demostraron un alto nivel de heterogeneidad de las cepas de *T.*

harzianum y otras especies (Muthumeenakshi *et al.*, 1994; Gams & Meyer, 1998; Hermosa *et al.*, 2000; Samuels *et al.*, 2002; Chaverri *et al.*, 2003;). Hermosa *et al.* (2004) en su estudio determinaron una alta variabilidad dentro de la sección *Pachybasium* y en particular dentro del complejo *T. harzianum/T. inhamatum*, observados previamente. La variabilidad genética intra específica, entre las cepas de *T. harzianum* provenientes de las diferentes áreas de la región triguera, podría asociarse al concepto de que *Trichoderma* es un hongo diploide y heterotálico (Seidl *et al.*, 2009). Cepas diferentes tienden a recombinarse y evolucionar rápidamente en función de las frecuencias del tipo de apareamiento. Además, otros mecanismos, tales como mutaciones, la recombinación y la migración podrían explicar la diversidad genética observada en este estudio (Chaverri *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2009).

Con respecto a que: “Los grupos de cepas con iguales perfiles genéticos se asocian a individuos con el mismo potencial antagonista.”

Con los resultados de los 6 marcadores ISSR se agruparon las cepas del presente estudio, en tres grupos de similitud. Estos grupos no presentaron correspondencia con el origen geográfico, el años de aislamiento y con distintos niveles de antagonismos. Hermosa *et al.* (2004) analizaron 69 cepas de *Trichoderma* no encontraron, al igual que en este estudio, correlación significativa entre el origen geográfico o nicho ecológico y las cepas mencionadas. Resultados similares fueron obtenidos por Goes *et al.* (2002) en Brasil y Sharma *et al.* (2009) en la India. Sin embargo, Consolo *et al.* (2012) observaron una correspondencia parcial entre los patrones de polimorfismo y la agresividad de los aislamientos de *Trichoderma* spp. de diferentes agroecosistema en Argentina. Muthumeenakshi *et al.* (1994), lograron asociar el polimorfismo de las cepas irlandesas de *T. harzianum* con su agresividad en el cultivo de champiñón, utilizando diferentes técnicas moleculares. Esta heterogeneidad en los resultados se atribuye a la alta variabilidad genética encontrada en la especie, que ya ha sido discutida previamente.

En relación a que: “Las pruebas fisiológicas realizadas con *T. harzianum* producen la máxima discriminación entre las cepas estudiadas.”

Tal como se observó en los resultados de caracterización fisiológica de las 37 cepas de *T. harzianum*, todas presentaron la capacidad de crecer en medios cuyas fuentes carbonadas fueron ácido cítrico y lactosa. Solo muy pocas cepas lograron cambiar la coloración de estos medio. Kubicek *et al.* (2003) determinaron una gran versatilidad de los aislamientos de *T. harzianum*, que mostraron un crecimiento óptimo

en una variada cantidad de fuentes de carbono. Esta alta versatilidad se puede explicar por qué *T. harzianum* es la especie más abundante de *Trichoderma* y se encuentra en casi todos los hábitats (Kullnig *et al.*, 2000). Por otra parte, ninguna de las cepas estudiadas creció a pH extremos y a temperatura extrema (40 °C). Resultados similares fueron publicados por Consolo *et al.* (2012). Dada la escasa variabilidad encontrada en los caracteres fisiológicos estudiados, por sí solos no generaron la máxima discriminación entre las cepas. Por esta razón, para establecer nuevos grupos infraespecíficos en *T. harzianum*, Grondona *et al.* (1997) y Consolo *et al.* (2012) proponen la integración de los atributos fisiológicos y bioquímicos, junto con criterios morfológicos clásicos.

Analizando la siguiente afirmación: “La eficiente actividad lítica de las cepas de *Trichoderma* sobre las paredes celulares de *M. graminicola* se correlaciona con la actividad biocontroladora frente este patógeno.”

Los resultados presentados en este trabajo evidencian la importancia de la resistencia sistémica inducida, actuando en la defensa de la planta contra *S. tritici*. Sin embargo es importante destacar que las especies de *Trichoderma* pueden actuar a través de diversos mecanismos de acción biológico, en forma sinérgica, para lograr el control de las enfermedades (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2009; Lorito 2010; Martínez *et al.*, 2013). Consolo *et al.* (2012) pudo relacionar la agresividad de las cepas frente a diferentes patógenos por la actividad hidrolítica de sus enzimas. En este estudio, los altos niveles de actividad para la β -1-3 glucanasa, la quitinasa y la proteasa producidos por las cepas 2 y 8 deberán ser correlacionados con la agresividad de cada una de las cepas en enfrentamientos “in vitro” con el patógeno *S. tritici*. En relación a la recomendación anterior, Walker (2010) demostró la inhibición de la germinación de los conidios de *S. tritici* con 2 cepas de *T. harzianum*. Además, estas cepas generaron alteraciones del micelio de *S. tritici*, como la vacuolización de las hifas con plasmólisis del micelio y el aspecto toruloso generados por la acción enzimática.

Cabe resaltar que la incorporación de los estudios de variabilidad genética en la integración de los restantes atributos logra una clara correspondencia entre las cepas y su origen geográfico. Resultados similares fueron obtenidos por Chaverri *et al.* (2003) en su estudio filogenético. Estos autores encontraron una débil correlación, pero no significativas, entre los siete linajes de *T. harzianum/H. lixii* y su origen geográfico. Contrariamente, Sharma *et al.* (2009) no hallaron relación entre el

polimorfismo, la agresividad y el origen de las cepas. La importancia en este trabajo, de sumar la variabilidad genética al estudio de integración, se fundamenta en que la evolución de un linaje manifiesta la composición genética y fenotípica (incluye las características morfológicas y fisiológicas) de los individuos en un determinado ambiente. Por esta razón se logró asociar a las cepas por su lugar de origen. Esto significa que si una línea genética evoluciona en diferentes ambientes desarrollará propiedades diferentes impuestas por el medio ambiente en particular o por las condiciones ecológicas dominantes (Sharma *et al.*, 2009; Consolo *et al.*, 2012).

5. CONCLUSIONES

Por todas las consideraciones mencionadas en este estudio se determina qué:

La hipótesis 1: “La integración de los atributos fisiológicos y bioquímicos junto con criterios morfológicos clásicos, sirven para establecer nuevos grupos infraespecíficos.”

Se acepta.

La hipótesis 2: “Las diferencias entre los grupos infraespecíficos se correlacionan con diferentes niveles de actividad biocontroladora sobre la mancha de la hoja del trigo.”

Se rechaza.

La hipótesis 3 “Las características morfológicas estudiadas varían dentro de los rangos aceptados por la taxonomía clásica, aunque por sí solas no permiten la diferenciación en grupos dentro de la especie.”

Se acepta

La hipótesis 4 “Las cepas de *T. harzianum*, provenientes de diferentes áreas trigueras, se caracterizan por la heterogeneidad en sus patrones genéticos, demostrando la naturaleza genética de su variabilidad.”

Se acepta

La hipótesis 5: “Los grupos de cepas con iguales perfiles genéticos se asocian a individuos con el mismo potencial antagonista.”

Se rechaza

La hipótesis 6: “Las pruebas fisiológicas realizadas con *T. harzianum* producen la máxima discriminación entre las cepas estudiadas.”

Se rechaza

La hipótesis 7: “La eficiente actividad lítica de las cepas de *Trichoderma* sobre las paredes celulares de *M. graminicola* se correlaciona con la actividad biocontroladora frente este patógeno.”

Se acepta

6. FUTURAS INVESTIGACIONES

A partir de este estudios

- ✓ Se deberá completar los análisis moleculares de las cepas en estudio realizados con la secuencias del ITS1 e ITS2 con los marcadores *tef1* y *rpb2*. Esto permitirá incorporarlas a la base de datos disponible en www.isth.info. Esta base de datos es específica para *Trichoderma* y brinda mayor confiabilidad.
- ✓ Se deberán ampliar las pruebas con diferentes fuentes carbonadas y nitrogenadas. Además se deberán incorporar ensayos de crecimiento de las cepas con diferentes agroquímicos. Para determinar el momento oportuno de aplicación en la práctica.
- ✓ Se deberán ampliar los ensayos de comportamiento antagónico de cada una de las cepas frente a *S. tritici* para correlacionarla con la actividad enzimática. Además de realizar pruebas de biocontrol en diferentes patosistemas para ampliar el uso de las mismas en el campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed H.U., Mundt C.C., Coakley S.M. 1995. Host pathogen relationship of geographically diverse isolates of *Septoria tritici* and wheat cultivars. *Plant Pathology* 44: 838-843.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Alippi A., Perelló A., Sisterna M., Greco N., Cordo C. 2000. Biological control of wheat foliar diseases with spore-forming bacteria. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 107: 155-169.
- Anderson I.C. & Cairney J.W.G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental microbiology* 6(8), 769–79.
- Annone J., Calzadori O., Polidoro H., Conta H. 1991. Efecto de la mancha de la hoja causada por *Septoria tritici* sobre el rendimiento. INTA EEA Pergamino. Informe N° 122, 4 pp.
- Annone J.G. 2005. El desafío del manejo integrado de enfermedades de los cultivos en sistemas agrícolas conservacionistas: El caso de la sanidad del trigo en siembra directa. In: *Proceedings of the 13th Congreso Latinoamericano de Fitopatología*, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 19–22 April 2005, pp 161–164.
- Annone J. & García R. 2005. Trigo: Panorama sanitario de la campaña 2004/2005 y perfil sanitario de cultivares de trigo en la región norte de Buenos Aires. Informe EEA INTA Pergamino, pp. 3.
- Aptroot A. 2006. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 2. *Conspectus of Mycosphaerella*. CBS Biodiversity Series 5: 1–231.
- Arama P.F. 1996. Effects of cultivar, isolate and environment on resistance of wheat to *Septoria tritici* blotch in Kenya. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands 115 pp.
- Arias M. 2004. Hongos Antagonistas o micopatógenos en: *Guía de insumos biológicos para el Manejo Integrado de Plagas*. Corporación para Desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos Armonía p. 59-62.

- Arraiano L.S., Worland A.J., Ellerbrook C., Brown, J.K.M. 2001. Chromosomal location of a gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat 'Synthetic 6x'. *Theor Appl Genet* 103: 758–764.
- Baath E. 1991. Tolerance of copper by entomogenous fungi and the use of copper-amended media for isolation of entomogenous fungi from soil. *Mycological Research* 95:1140–1142.
- Baek J.M., Howell C.R., Kenerley C.M. 1999. The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 35: 41-50.
- Bailey B.A., Korcak R.F., Anderson J.D. 1993. Sensitivity to an ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase in *Nicotiana tabacum*-L cv *xanthi* is controlled by a single dominant gene. *Plant Physiology* 101:1081–88.
- Bailey K.L., Gossen B.D., Lafond G.P., Watson P.R., Derksen D. 2001. Effect of tillage and crop rotation on root and foliar diseases of wheat and pea in Saskatchewan from 1991 to 1998: Univariate and multivariate analyses. *Canadian Journal of Plant Science* 81(4), 789–803.
- Ballantyne B. 1985. Resistance to speckled leaf blotch of wheat in southern New South Wales. In: A.L. Scharen, ed. *Septoria of Cereals. Memoria del taller celebrado del 2 al 4 de agosto de 1983*, Bozeman, MT. USDA-ARS Publ. No. 12. Pp. 31-32.
- Banke S. & McDonald B.A. 2005. Migration patterns among global populations of the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* 14: 1881-1896.
- Benítez T., Delgado-Jarana J., Rincón A.M., Rey M., Limón M.C. 1998 Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (ed) *Recent research developments in microbiology*, vol. 2. Research Signpost, Trivandrum, pp 129-150.
- Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7, 249-260.
- Besoain X. 2005. Control biológico de *Pyrenochaeta lycopersici* y *Phytophthora nicotianae* en tomates bajo invernadero. Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas,

http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/13.html.

- Bigirimana J., De Meyer G., Poppe J., Elad Y., Hofte M. 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 62, p. 1001–1007.
- Bind-Schedler L.V., Sanchez P., Dunn S., Mikan J., Thangavelu M., Clarkson J., Cooper R.M. 2002. Deletion of the SNP1 trypsin protease from *Stagonospora nodorum* reveals another major protease expressed during infection. Fungal Genetics and Biology 38:43–53.
- Bissett J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany 62: 924-931.
- Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany 69: 2357-2372.
- Bissett J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany 69: 2373-2417.
- Bissett J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany 69: 2418-2420.
- Bissett J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany. 70:639-641.
- Boller T. & He ShY. 2009. Effectors in microbial pathogens pattern recognition receptors in plants and innate immunity in plants: An arms race between. Science 324: 742-44.
- Boeger J.M., Chen R.S., Mc Donald B.A. 1993. Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. Phytopathology 83: 1147-1154.
- Bornet B. & Branchard M. 2001. Nonanchored inter sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol Biol Rep 19: 209–15.
- Bradding P.A., Kema G.H.J. Brown J.K.M. 1999. A possible gene-for-gene relationship for *Septoria tritici* leaf blotch resistance in wheat. In: van Ginkel, M., McNab, A., Krupinsky,

- J. (eds.): *Septoria and Stagonospora diseases of cereals. A compilation of global research*. CYMMYT, México. pp. 54-55.
- Brading P.A., Verstappen E.C.P., Kema G.H.J., Brown J.K.M. 2002. A gene for gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. *Phytopathology* 92: 439-445.
- Bridge PD. 1985. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* Subsection *Fasciculata*. *Journal of general microbiology* 131: 1887–1895.
- Brokenshire T. 1975. The role of graminaceous species in the epidemiology of *Septoria tritici* on wheat. *Plant Pathology*. 24:33-38.
- Brocius S.C., Frank J.A., Frederik J.R. 1985. Influence of winter wheat management practices on the severity of powery mildew and septoria blotch in Pennsylvania. *Phytopathology* 75: 538-542.
- Brotman Y., Briff E., Viterbo A., Chet I. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Tricho-* derma, in plant root colonization. *Plant Physiology* 147:779–8.
- Brown J.S., Kellock A.W., Paddick R.G. 1978. Distribution and dissemination of *Mycosphaerella graminicola* (Fückel) Schroeter in relation to the epidemiology of speckled leaf blotch of wheat. *Ausl. Agric. Research* 29: 1139-45.
- Browning J.A. 1979. Genetic protective mechanisms of plant pathogen populations: Their coevolution and use in breeding for resistance. In: M.K. Harris, ed. *Biology and Breeding for resistance*. Texas A y M University Press, College Station, Texas. Publ. MP-1451. Pp 52-57.
- Bulat S.A., Lübeck M., Mironenko N., Jensen D.F., Lübeck P.S. 1998. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Mycol Res* 102: 933–943.
- Buston H.W., Moss M.O., Tyrell D. 1966 The influence of carbon dioxide on growth and sporulation of *Chaetomium globosum* *Trans British Mycological Society* 49:387-396.
- Butt T.M., Jackson C., Magan N. 2001. Introduction-Fungal biological control agents: Progress, problems and potential. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (eds.). *Fungal Biocontrol Agents: Progress Problem and Potential*, pp. 1-8. CABI, Wallingford.

- Cabrifiga Olamendi J. 2005. Fire blight (*Erwinia amylovora*) of rosaceous plants, pathogen virulence and selection and characterization of biological control agent. Doctoral Thesis. Universitat de Girona, España.
- Caldwell R.M. & Narvaez I. 1960. Losses of winter wheat from infection by *Septoria tritici* *Phytopathology* 50: 630.
- Camporota P. 1985. Antagonisme *Trichoderma* de solani spp vis-à-vis de *Rizoctonia solani* Kühn. *Agronomie*; 5:613-620.
- Carmona M., Reis E.M., Cortese P. 1999. Manchas foliares del trigo: Mancha amarilla y Septoriosis de la hoja- diagnóstico, epidemiología y nuevos criterios para el manejo. BASF Argentina S.A. pp. 32.
- Carmona M. & Reis E.M. 2001. Sistema de puntuación para la evaluación del potencial de producción del cultivo de trigo. Su utilidad para la aplicación racional y económica de fungicidas. Carmona M., (ed.) Buenos Aires, Argentina.
- Carmona M. 2004. Manejo integrado de enfermedades de Trigo. Nuestra oportunidad para asegurar la sustentabilidad del cultivo de trigo. Actas de Congreso a Todo Trigo 13 y 14 de Mayo Mar del Plata Buenos Aires Argentina, pp 33-42.
- Carmona M.A., Sautua F.J., Reis. E.M. 2013. Capítulo II. Control de enfermedades fúngicas del trigo mediante fungicidas. Enfermedades del trigo: avances científicos en la argentina. Coordinadores: Cordo, C. A. y Sisterna, M. N.. En prensa.
- Carretero R. 2010. Enfermedades foliares del trigo: Entender cómo funciona el sistema cultivo- enfermedad, *Agroconsultas online*, 4453, 1–7.
- Castillo N. 2010. Caracterización de aislamientos argentinos del agente causal de la mancha de la hoja del trigo (*Mycosphaerella graminicola*) e identificación de marcadores moleculares asociados a genes de resistencia al patógeno. Tesis doctoral FCNYM. UNLP.
- Chartrain L., Brading P.A., Widdowson J.P., Brown J.K.M. 2004. Partial resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat cultivars Arina and Riband. *Phytopathology* 94: 497-504.
- Chaverri P., Samuels G.J., Stewart E.L. 2001. *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia* 93: 1113–1124.

- Chaverri P. & Samuels G.J. 2002. *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Prog.* 1:283-286.
- Chaverri P., Castlebury L.A., Samuels G.J., Geiser D.M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Mol Phylogenet Evol* 27: 302-313.
- Chaverri P., Castlebury L.A., Overton B.E., Samuels G.J. 2003 a. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia* 95: 1100–1140.
- Chen R.S. & Mc. Donald B.A. 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics* 142: 1119-1127.
- Chet I., Harman G.E., Baker R. 1981 *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microb. Ecol.* 7, 29–38.
- Chet I. 1987. *Trichoderma*—application, mode of action and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet I (ed) *Innovative approaches to plant disease control*. Wiley, New York, pp 137–160.
- Chet I. & Inbar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* 48: 37-43.
- Chet I. Inbar J, Hadar I., 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp 165-184.
- Chet I., Benhamou N., Haran S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 2). Kubicek C. P. y Harman G. E. (eds). Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. pp. 153-172.
- Consolo V.F., Cordo C.A., Salerno G.L. 2005. Mating-type distribution and fertility status in *Magnaporthe grisea* populations from Argentina *Mycopathologia* 160 (4), 285-290.
- Consolo V.F., Albani C.M., Berón C.M., Salerno G.L., Cordo C.A. 2009. A conventional PCR technique to detect *Septoria tritici* in wheat seeds. *Australasian Plant Pathology* 38 (3): 222-227.

- Consolo V.F., Mónaco C.I., Cordo C.A., Salerno G.L. 2012. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1389–1398.
- Cook R.J., Boosalis M.G., Douppnik B. 1978. Influence of crop residue on plant disease. In: *Crop residue management systems*. ASA, CSSA, SSSA. Madison, USA. pp. 147-163.
- Cook J.R. & Baker K.F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.
- Cook R.J. 1997. Biological control of soilborne plant pathogens: past, present and future. En *Proceedings of the International Symposium of Clean Agriculture*, pp. 35-48.
- Cordo C.A. 1979. Mancha de la hoja del trigo (*S. tritici*) en la Republica Argentina. *Boletin de CIC* N° 29.
- Cordo C.A., Perelló A.E., Alippi H.E., Arriaga H.O. 1990. Presencia de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter teleomorfo de *Septoria tritici* Rob. ex Desm. en trigos maduros de la Argentina. *Revista Facultad Agronomía* 66/67:49-55.
- Cordo C.A. & Arriaga H.O. 1990. Variación en patogenicidad entre cepas argentinas de *Mycosphaerella graminicola* (anamorfo *Septoria tritici*). In: Kohli M. M. & van Beuningen L.T. (eds.), *Conferencia Regional sobre septoriosis del trigo* , pp. 88 -100. CIMMYT, México, D. F.
- Cordo C., Perelló A., Arriaga H., Benedicto G., Avila V., Zigilino I. 1994. Resistencia a la “mancha foliar” causada por *Septoria tritici* en el trigo pan (*Triticum aestivum* L.). *Rev. Fac. Agron. La Plata* 70: 23-36.
- Cordo C., Perelló A., Arriaga H. 1998. Cambio en la virulencia de las poblaciones de *Mycosphaerella graminicola* Fuck Schroether sobre Trigo. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 13: 77-86.
- Cordo C.A., Simón M.R., Perelló A.E., Alippi H.E. 1999. Spore dispersal of leaf blotch pathogens of wheat (*Mycosphaerella graminicola* and *Septoria tritici*). In: van Ginkel, M., McNab, A., Krupinsky, J. (eds.), *Septoria and Stagonospora diseases of cereals. A compilation of global research*. CYMMYT, México. pp. 98-101.

- Cordo C., Mónaco C., Simón M.R., Perelló A., Kripelz N., Bayo D., Segarra C. 2004. Biocontrol de la mancha de la hoja del trigo con aislamientos de *Trichoderma* spp.. VI Congreso Nacional de trigo, Actas del Congreso, Ed. INTA p. 205. 2004.
- Cordo C.A., Simón M.R., Perelló A E., Bayo D., Kripelz N., Larrán, S. 2005. Environmental factors affecting the release and dispersal of pycnidiospores and ascospores of *Mycosphaerella graminicola*. Abstracts of the 7th International Wheat Conference. Mar del Plata. Argentina. p.131.
- Cordo C., Mónaco C., Segarra C., Simón M.R., Mansilla Y.A., Perelló A., Kripelz N., Bayo D., Conde R.D. 2007. *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici* .Biocontrol Science and Technology, 17: 687-698.
- Cordo C., Simón M.R., Stocco M., Lampugnani G., Abramoff C., Kripelz N., Alonso N., Paredes E., Navarrete F., Aventin J., Mónaco C. 2011. *Combined treatments to reduce Septoria tritici* in wheat and their impact on crop yield and its components. 8th International Symposium on *Mycosphaerella* and *Stagonospora* Diseases of cereals. 11-14 de septiembre Mexico City, Mexico.P 81.
- Cordo C., Simón M.R., Stocco M., Lampugnani G., Abramoff C., Kripelz N., Mónaco C. 2012. Aplicaciones de *Trichoderma harzianum* y su efecto sobre las curvas de progreso de la Septoriosis del trigo y el rendimiento. XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Potrero de los Funes. San Luis. Poster. Octubre 2012.
- Crous P.W. 2009. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. Fungal Diversity 38: 1–24.
- Cumagun C.J.R., Hockenhull J., Lübeck M. 2000. Characterization of *Trichoderma* isolates from Philippine rice fields by UP-PCR and rDNA-ITS1 analysis: identification of UP-PCR markers. Phytopathology 148:109–115.
- Cunfer B. 1994. Taxonomy and nomenclature of *Septoria* and *Stagonospora* species on cereals. IHAR Radzików 4-7 july 1994. 4th International Workshop on: *Septoria* of cereals.
- Cunfer B. 2000. *Stagonospora* and *Septoria* diseases of barley, oat and rye. Canadian Journal of Plant Pathology 22 (4): 332-347.

- Dal Bello G., Mónaco C., Chaves R. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Rev Iberoam Micol*, 14, 131–134.
- Dal Bello G, Mónaco C, Sisterna M, Simón M. 2001. Control biológico del tizón de la plántula de trigo. Jornada Nacional de Planes y Estrategias de Control de Plagas. 23 y 24 de Julio de 2001. Universidad de Morón, Morón. SENASA.
- Dal Bello G., Rollán M. C., Lampugnani G., Abramoff C., Ronco L., Larrán S., Mónaco C. 2011. Biological control of leaf grey mould of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *International Journal of Pest Management* 57(3): 177–182.
- Dal Bello G. & Mónaco, C. 2013. Capítulo V. Manejo de enfermedades con agentes biocontroladores. Enfermedades del trigo: avances científicos en la Argentina. Coordinadores: Cordo, C. A. y Sisterna, M. N.. En prensa.
- Danielson R. & Davey C. 1973. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology & Biochemistry* 5 (5):495-504.
- Davies J.S. & Westlake D.W.S. 1979. Crude oil utilization by fungi. *Can.J. Microbiol.* 25:146-156.
- De la Cruz J.A., Hidalgo-Gallego J.M., Lora T., Benítez J.A., Pintor-Toro J., Llobell A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry* 206: 856–867.
- De la Cruz J., Pintor-Toro J., Benítez T., Llobell A. 1995. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal of bacteriology* 177(7): 1864–71.
- Degenkolb T., Gräfenhan T., Nirenberg H.I., Gams W., Brückner H. 2006. *Trichoderma brevicompactum* Complex: Rich Source of Novel and Recurrent Plant-Protective Polypeptide Antibiotics (Peptaibiotics). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7047–7061.
- Degenkolb T., Dieckmann R., Nielsen K.F., Gräfenhan T., Theis C., Zafari D., Chaverri P., Ismaiel A., Brückner H., von Döhren H., Thrane U., Petrini O., Samuels G.J. 2008. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress* 7: 177–219.

- Diaz M.A. 1983. Variabilidad patogénica de *Septoria trilió* Rob. ex Desm. Investigaciones Agronómicas 4:46-50.
- Dinolfo M.I., Stenglein S., Moreno M.V., Nicholson P., Jennings P., Salerno G.L. 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *European Journal of Plant Pathology* 127(4): 483–491.
- Djerbi A., Ghodbane A., Daaloul A., Varughese G. 1976. Studies on the *Septoria* leaf blotch disease of wheat: search for resistant germplasm to *Septoria tritici* Rob. and Desm. *Poljopr. Znan. Smotra* 39:137-142.
- Djonović S., Dangott L., Kenerley C. 2005. SM1, a 12.6-kDa proteinaceous elicitor produced by *Trichoderma virens* induces systemic resistance in cotton. *Phytopathology* 95:S25.
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular plant-microbe interactions* 19(8): 838–53.
- Dodd S.L., Crowhurst R.N., Rodrigo A.G., Samuels G.J., Hill R.A., Stewart A. 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 104: 23–34.
- Dodd S.L., Lieckfeldt E., Chaverri P., Overton B.E., Samuels G.J. 2002. Taxonomy and phylogenetic relationships of two species of *Hypocrea* with *Trichoderma* anamorphs. *Mycological Progress* 1: 409–428.
- Doi Y. 1972. Revision of the Hypocreales with cultural observations IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan. Enumeration of the species. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo* 15:649-751.
- Domsch K., Gams W., Anderson TH. 2007. *Compendium of soil fungi*. Second edition Taxonomically revised by Gams W. IHW- Verlag-Eching.
- Dos Santos A.F. & Dhingra O.D. 1980. Pathogenicity of *Trichoderma* spp on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* *Can J Bot* 60: 472-475.
- Druzhinina I., Koptchinski A., Komon M., Bissett J., Szakacs G., Kubicek C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol* 42:813–828.

- Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47(2): 55–64.
- Druzhinina I.S., Kubicek C.P., Komon-Zelazowska M., Belayneh T., Bissett J. 2010. *Trichoderma harzianum* is a recent agamospecies isolated from numerous sibling relicts and several genetically close biological species. *BMC Evolutionary Biology* 10:94.
- Durán E., De Romero Y., Romero M., Ramallo J. 2007. Sensibilidad in vitro de cepas de *Trichoderma* aisladas de semillas de soja frente al fungicida MAXIM® XL. *Boletín Micológico* 22: 51-54.
- Efron B. 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife *Ann. Statist.* Volume 7, Number 1, 1-26.
- Eisendle M., Oberegger H., Buttinger R., Illmer P., Haas H. 2004. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC- mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Euk Cell* 3:561-563.
- Elad Y., Chet I., Henis I. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* sp. from soil. *Phytoparasitica*, 71: 59-67.
- Elad Y., Chet I., Hennis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* 28: 719-725.
- Elad Y. & Kapat A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:177–89.
- El-Katatny M.H., Gudelj M., Robra K.H., Elnaghy M.A., Gubitz G.M. 2001. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:137-143.
- Espósito E. & Dasilva M. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Microbiology* 24: 89-98.
- Eyal Z., Amiri Z., Wahl I. 1973. Physiologic specialization of *Septoria tritici*. *Phytopathology* 63: 1087-1091.

- Eyal Z. & Brown M.B. 1976. A quantitative method for estimating density of *Septoria tritici* pycnidia on wheat leaves. *Phytopathology* 66: 11-14.
- Eyal Z., Scharen A., Prescott J. 1985. Global insights into virulence frequencies of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 75: 1456-1462.
- Eyal Z., Scharen A.L., Prescott J.M., van Ginkel M., 1987. *Conceptos y métodos relacionados con el manejo de estas enfermedades*. International Maize and Wheat Improvement. CIMMYT, México, D.F. pp. 52.
- Fálico L. & Varaschin C. 2007. Experiencias de implantación de trigo con microorganismos incorporados a la siembra. Jornadas de actualización en enfermedades de Trigo. 23 de nov.2007 Llavallol, Buenos Aires, Argentina.
- Gams W. & Bissett J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3-34. - In C. P. Vol. 1. Kubicek and G. E. Harman (eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis Ltd., London, U.K.
- Gams W. & Meyer W. 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum*? *Mycologia* 90: 940–915.
- García I., Lora J.M., De la Cruz J., Benítez T., Llobell A., Pintor-Toro J.A. 1994. Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 27, 83–89.
- Gardes M. & Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: Bruns application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Mol Ecol* 2: 113– 118.
- Garrido M. 2009. *Trichoderma*. Disponible en: <http://miguelgarridorondoy.blogspot.com/2009/07/trichoderma.html>.
- Gaunt R.E., 1995. The relationship between plant disease severity and yield. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 119-144.
- Geremia R.A., Goldman G.H., Jacobs D., Aviles W., Vila S.B., Van Montagu M., Herrera-Estrella A., 1993. Molecular characterization of the proteinase- encoding gene, prb1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular Microbiology* 8: 603– 613.

- Gherbawy Y., Druzhinina I., Shaban G.M., Wuczkowsky M., Yaser M., El-Naghy M.A., Prillinger H.J., Kubicek C.P. 2004. Trichoderma populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycol. Prog.* 3, 211–218.
- Ghislain M., Zhang D., Fajardo D., Huaman Z., Hijmans R. 1999. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 547-555. Holanda.
- Gill B.S. 2010. Introduction Compendium of wheat diseases and pests Edited by Bockus, W.; Bowden, R.; Hunger, R.; Morrill, W.; Murray, T.; Smiley, R. The American Phytopathological Society.
- Góes L.B., Bolena A., Lopes L., Freire D.C. 2002. Randomly Amplified Polymorphic DNA of Trichoderma Isolates and Antagonism Against *Rhizoctonia solani*, 45, 151–160.
- Gómez R.P., Simón M.R., Mónaco C.I., Kripelz N.I., Cordo C.A. 2008. Mineralización de los rastrojos de trigo y comunidades microbianas asociadas para el control cultural de la septoriosis. 2,3 y 4 de julio 2008. Congreso Nacional de trigo La Pampa.
- González I., Infante D., Martínez B., Arias Y., González N., Miranda I., Peteira B. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Biotecnología Aplicada* 29: 7-11.
- Goodwin R.M. & Zismann V.L. 1999. *Septoria passerinii* Closely Related to the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Eds van Ginkel, M., A. McNab, and J. Krupinsky. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. Mexico, D.F.: CIMMYT. Pp 34-36.
- Gough F.J. 1978. Effect of wheat host cultivars on pycnidiospore production by *Septoria tritici*. *Phytopathology* 68: 1343-1345.
- Gower J. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, 27, 857–874.
- Grant W.D. & Long P.E. 1989. *Microbiología ambiental*. (ed.) Acribia. 222 pp.
- Groenewald M., Groenewald J.Z., Braun U, Crous P.W. 2006. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola*, and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. *Mycologia* 98: 275–285.

- Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M., Mateos P., Bridge P., Monte E., Garcia-Acha I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3189-3198.
- Grondona I., Morales R., Hermosa M.R., Redondo J., Rico C., Monte, E. 2001. Biological control of *Rhizoctonia solani* in traditional-sowed and transplanted sugarbeet. *J Plant Pathol* 83: 483-485.
- Hagn A., Pritsch K., Schloter M., Munch J.C. 2003. Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. *Biol. Fert. Soils* 38: 236-244.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.
- Harman G.E., Petzoldt R., Comis A., Chen J. 2004 a. Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94(2): 147–53.
- Harman G. 2014. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). <http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html>. Cornell University. College of Agriculture and life science.
- Hayden N.J., Jones D.J., Gillison L.J. 1994. The role of legume-fixed nitrogen and mixed cropping systems in the management of *Septoria tritici*. In: E. Arseniuk, T. Goral, P. Czembor (eds), *Proceeding of the 4th International Workshop on: Septoria of Cereals*. IHAR Radzikow, Poland, pp. 243.245.
- Hayes C.K., Klemsdal S., Lorito M., Di Pietro A., Peterbauer C., Nakas J.P., Tronsmo A., Harman G.E. 1994. Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzia-num*. *Gene* 138:143–148.
- He P., Shan L., Sheen J., 2007. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern- triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microorganismology* 9: 1385-96.

- Hermosa M.R., Grondona I., Iturriaga E.A., Díaz-Mínguez J.M., Castro C., Monte E., García-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1890–1898.
- Hermosa M.R., Grondona I., Diaz-Minguez J.M., Iturriaga E.A., Monte E. 2001. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr Genet* 38: 343–350.
- Hermosa M.R., Keck E., Chamorro I., Rubio B., Sanz L., Vizcaíno J., Monte E. 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, 108(8): 897–906.
- Hermosa R., Rubio M.B., Cardoza R.E., Nicolás C., Monte E., Gutiérrez S. 2013. The contribution of trichoderma to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16, 69–80.
- Hoitink H.A. & Chung R. 1989. Interactions between *Trichoderma hamatum* and termophilic fungi in bark compost in suppression of *Rhizoctonia* damping-off. *Phytopathology* 79:1152.
- Hooker A.L. 1957. Methods of inoculation and determining varietal reactions in the *Septoria* disease of oats. *Plant Dis. Rep.* 41: 592-597.
- Hora T.S. & Baker R. 1972. Soil fungistasis: microflora producing a volatile inhibitor. *Trans Br Mycol Soc* 59:491-500.
- Howard D.D., Chambers A.Y., Logan J. 1994. Nitrogen and fungicide effects on yield components and disease severity in wheat. *J. Prod. Agric.* 7: 448-454.
- Howell C.R., Stipanovic R.D., Lunsen R.D. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology* 3: 435-441.
- Howell C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: G.E. Harman GE., Kubicek C.P. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2, pp. 173-184. Taylor and Francis, London.
- Howell C.R., Hanson L.E., Stipanovic R.D., Puckhaber L.S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248–252.

- Howell C.R. 2003. Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases 87(1): 4-10.
- Howell C.R. 2006. Understanding the mechanisms employed by Trichoderma virens to effect biological control of cotton diseases. Phytopathology 96: 178-180.
- Hunter T., Coker R.R., Royle D.J. 1999. Studies on the sexual phase of leaf blotch in UK winter wheat. In: Lucas, J.A., Bowyer, P., Anderson, H.M. (eds.): *Septoria of cereals: A study of pathosystems*. pp. 108-114. IACR, Long Aston, University of Bristol, UK.
- Hutchinson S.A. 1971 Biological activities of volatile fungal metabolites. Trans Br Mycol Soc; 57: 185-200.
- Informe Productivo Trimestral Análisis sectorial de la economía real segundo trimestre 2012 Subsecretaría de Coordinación Económica y Mejora de la Competitividad Dirección de Coordinación de Políticas Productivas.
- Ingold C.T. 1964. Dispersal in Fungi. Clarendon Press, Oxford. 208 p.
- INTA – FAO. 1979. Curso de perfeccionamiento en control integrado de plagas. EEA Pergamino INTA. Tomos I y II.30 p.
- Israel S., Mawar R., Lodha S. 2005. Soil solarization, amendments and bio-control agents for the control of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* in aridisols. Annals of Applied Biology 146: 481-491.
- Jaklitsch W.M., Komon M., Kubicek C.P., Druzhinina I.S. 2006 a. *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph. Mycologia 98:499-513.
- Jaklitsch W.M., Samuels G.J., Dodd S.L., Lu B.S., Druzhinina I.S. 2006 b. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. Studies in Mycology 56: 135–177.
- Jaklitsch W.M., Kubicek C.P., Druzhinina I.S. 2008. Three European species of *Hypocrea* with reddish brown stromata and green ascospores. Mycologia 100: 796–815.
- Jaklitsch W.M. 2009. European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. Stud Mycol. 2009;63:1–91.

- Jaklitsch W.M. 2011. European species of *Hypocrea*. Part II. The species with hyaline asospores. *Stud Mycol.* ;48:1–250.
- Jeque F.A., Simón M.R., Cordo C., Mónaco C. 2008. Control biológico de la mancha de la hoja del trigo con *Trichoderma harzianum*. VII Congreso Nacional de trigo. V Simposio Nacional de Siembra Otoño-Invernal, I encuentro del MERCOSUR. 2, 3 y 4 de julio 2008 Santa Rosa. La Pampa. PV26.
- Jlibene M., Gustafson J.P., Rajaram S. 1994. Inheritance of resistance to *Mycosphaerella graminicola* in hexaploid wheat. *Plant Breed.* 112: 301–310.
- Johnson A.G. 1916. Septoria on barley. *Phytopathology* 6: 117.
- Johnston H.W., MacLeod J.A., Clough K.S. 1979. Effects of cycocel (CCC) and fungicide sprays on spring wheat grown at three nitrogen levels. *Canadian Journal of Plant Science* 59: 917-929.
- Jones J. & Dangl J. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323–29.
- Kema G.H.J. 1992. Resistance in spelt wheat to yellow rust. I. Formal analysis and variation for gliadins patterns. *Euphytica* 63: 207-217.
- Kema G.H.J. & van Silfhout C.H. 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86: 777-786.
- Kema G.H.J., Yu D., Rijkenberg F.H.J., Shaw M.W., Baayen R.P. 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology*, 86, 777–786.
- Kema G.H.J., Annone J.G., Sayoud R., Van Silfhout C.H., Van Ginkel M, De Bree J. 1996 a .Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* 86: 200–212.
- Khashnobish A. & Shearer C.A. 1996. Phylogenetic relationship in some *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria* species *Mycol. Res.*100:1355-1363.
- Kindermann J., El-Ayouti Y., Samuels G.J., Kubicek C.P. 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology* 24: 298–309.

- King J.E., Cook R.J., Melville S.C. 1983. A review of *Septoria* diseases of wheat and barley. *Annals of Applied Biology* 103, 345–373.
- Klein D. & Eveleigh D.E. 1998. Ecology of *Trichoderma*. Pages 57- 74 in: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London.
- Koike N., Hyakumachi M., Kageyama K., Tsuyumu S., Doke N. 2001. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. *European Journal of Plant Pathology* 107:523-533.
- Kopchinskiy A.G., Komon M., Kubicek C.P., Druzhinina I.S. 2005. TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research* 109: 657–660.
- Kraan G. & Nisi J.E. 1993. Septorioses of wheat in Argentina. Situation of the crop against the disease. P1-8, in *Proceedings of the Septoria tritici Workshop*, L. Gilchrist et al., Ed., pp. 20– 24, CIMMYT, Mexico City, Mexico.
- Kubicek-Pranz E.M. 1998. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Pag 95- 111- *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1 Kubicek . C. P. and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London.
- Kubicek C.P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C. Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genetics Biol.* 38, 310–319.
- Kuhls K., Lieckfeldt E., Borner T. 1995. PCR-fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microb Res* 150: 363–371.
- Kullnig C.M., Szakacs G., Kubicek C.P. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol. Res.* 104, 1117–1125.
- Kullnig-Gradinger C.M., Szakács G., Kubicek C.P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* 106: 757–767.
- Kumar M. & Sharma P. 2011. Molecular and morphological characters : An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp., *10(22)*, 4532–4543.

- Kwok O.C.H., Fahy P.C., Hoitink H.A., Kuter G.A. 1987. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology* 77: 1206-1212.
- Lafond G.P. & Derksen D.A. 1996. Long-term potential of conservation tillage systems on the Canadian prairies. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 151–158.
- Laghetta G., Piergiovanni A.R., Volpe N., Perrino P. 1999. Agronomic performance of *Triticum diccocon* Schrank and *T. spelta* L. accessions under southern Italian conditions. *Agric. Mediterr.* 129: 199-214.
- Larena I., Salazar O., González V., Julián M.C., Rubio V. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for asco- mycetes. *J Biotechnol* 75: 187–194.
- Latterell F. 1985. Longevity and pathogenic stability of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathologic* 76: 231–235.
- Lecuona R.1996. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. *En: Lecuona, R. (Ed.) Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. M. Más, Buenos Aires. pp. 143-150.*
- Lee S. & Gough F.J. 1984. Inheritance of *Septoria* leaf blotch (*S. tritici*) and *Pyrenophora* tan spot (*P. tritici repentis*) resistance in *Triticum aestivum* cv. Carifin 12. *Plant Dis.* 68: 848-851.
- Leitch M.H. & Jenkins P.D. 1995. Influence of nitrogen on the development of *Septoria* epidemics in winter wheat. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 124: 361-368.
- Lejeune R., Nielsen J., Baron G.V. 1995. Influence of pH on the morphology of *Trichoderma resei* QM 9414 in submerged culture. *Biotechnol. Lett.* 17: 341-344.
- Leuchtman A., Petrini O., Samuels G.J. 1996. Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia* 88: 384–394.
- Leung H., Borromeo E., Bernardo M., Notteghem J. 1988. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 78: 1227–1233.
- Lewis J.A. & Papavizas G.C. 1984. Chlamydospore formation by *Tri- choderma* spp. in natural substrates. *Can. J. Microbiol.* 30:1–7.

- Lieckfeldt E., Kuhls K., Muthumeenakshi S. 1998. Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: Kubicek CP, Harman GE, eds. *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics. pp. 35–56. Taylor & Francis Ltd. London.
- Lieckfeldt E., Samuels G.J., Helgard H.I., Petrini O. 1999. A morfological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species? *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2418–2428.
- Lieckfeldt E., Cavnac Y., Fekete C., Börner T. 2000. Endochitinase gene-based phylogenetic analysis of *Trichoderma*. *Microbiological Research* 155: 1–9.
- Lieckfeldt E., Kullnig M., Kubicek C.P., Samuels G.J., Börner T. 2001. *Trichoderma aureoviride*: Phylogenetic position and characterization. *Mycol. Res.* 105:313-322.
- Lo C.T., Liao T.F., Deng T.C. 2000. Induction of systemic resistance of cucumber to cucumber green mosaic virus by the root-colonizing *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 90 (Suppl.), S47 .
- López Lastra C.C., Hajek A.E., Humber R.A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Can. J. Bot.* 1126-1130.
- López-Mondéjar R., Ros M., Pascual J.A. 2011. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control* 56(1): 59–66.
- Lorito M., Harman G., Hayes C., Brodway R., Tronsmo S., Woo S., Di Pietro A. 1992. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiodidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Lorito M., Di Pietro A., Hayes C, Woo S., Harman G. 1993. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83: 721-728.
- Lorito M., Hayes C., Di Pietro A., Woo S., Harman G. 1994. Pufication, characterization, and synergistic activity of a Glucan 1,3- β -Glucosidase and an N-Acetyl- β -Glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84: 398-405.

- Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B., Kubicek C. P. 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal Bacteriol* 178: 6382-6385.
- Lorito M., Kubicek C.P., Harman G.E. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. (eds) *Trichoderma and Gliocladium* vol 2. Taylor and Francis, London, pp 73-99.
- Lorito M., Woo S.L., Harman G.E., Monte E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from o'mics to the field. *Annual review of phytopathology* 48: 395–417.
- Louvet J., Rouxel F., Alabouvette C. 1976. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. 1. Mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance d'un sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. *Annu Phytopathol*; 8:425-436. 6.
- Lovell D.J., Parker S.R., Hunter T., Royle D.J., Coker R.R. 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in winter wheat *Plant Pathology* 46: 126-138.
- Madariaga R. & Scharen A.L. 1985. *Septoria tritici* botch in Chilean wild oat. *Plant Dis.* 69: 126-127.
- Madariaga R. 1986. Presencia en Chile de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter estado sexual de *Septoria tritici* Rob. et Desm. *Agricultura Técnica (Chile)* 46: 209-211.
- Madariaga R.B., Bilchrist D.G., Martensen A. 1989. Presence and role of *Mycosphaerella graminicola* in California Wheat. *Phytopathology* 79: 1141.
- Manczinger L. & Polner G. 1987. Cluster analysis of carbon source utilization patterns of *Trichoderma* isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 9:214–217.
- Mansilla Y. 2012. Estudio Estructural y Funcional del Inhibidor de Serina – Proteasas tipo Germina presente en plantas de Trigo. Tesis doctoral. IIB-CONICET-UNMdP
- Margolles-clark E., Harman G.E., Penttila M. 1996. Enhanced Expression of Endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the *cbh1* Promoter of *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6): 2152–2155.

- Markovich N.A. & Kononova G.L. 2003. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39, 389–400.
- Martínez B., Infante D., Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.* 28 (1): 1–11.
- McBeath J. & Adelman M. 1991. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. *Phytopathology* 81(10):1151.
- Mc Cartney C.A., Brule-Babel A.L., Lamari L., Somers D.J. 2001. Chromosomal location of a race specific resistance gene to *Mycosphaerella graminicola* in the spring cultivar ST6. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1181-1186.
- Mc Donald B.A. & Martínez, J.P. 1990. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology* 80: 1368-1373.
- McIntyre M., Nielsen J., Arnau J., van der Brink H., Hansen K., Madrid S. (eds) 2004. *Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics*. Copenhagen, Denmark.
- McVey D.V. & Leonard K.J. 1990. Resistance to wheat stem rust in spring spelts. *Plant Dis.* 74: 966-969.
- Metha YR. 1989. Occurrence of *Septoria tritici* and its perfect state in Brazil. Third International Workshop on *Septoria* diseases of Cereales 4-7, 1989 Zurich Switzerland. Ed Dr. Fried PM.
- Miralles D.J. & González F.G. 2009. El trigo en Argentina: Perspectivas ecofisiológicas del pasado, presente y futuro para aumentar el rendimiento. pp. 11.
- Miyazaki K., Tsuchiya Y., Okuda T. 2009. Specific PCR assays for the detection of *Trichoderma harzianum* causing green mold disease during mushroom cultivation. *Mycoscience* 50(2): 94–99.
- Mónaco C. 2002. Posibilidades del manejo de enfermedades mediante el uso de antagonistas. Pág 309- 318 en: *Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable*. Editor Sarandon, S. Argentina.

- Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, 4: 1-4.
- Monteiro V.N. & Ulhoa C.J. 2006. Biochemical characterization of a β -1,3-Glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology*, 52:92-96.
- Moreno M.V., Stenglein S.A., Balatti P.A., Perelló A.E. 2008. Pathogenic and molecular variability among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat in Argentina. *Eur J Plant Pathol* 122:239–252.
- Morton C.O., Hirsch P.R., Kerry B. 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi - a review of application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology*; 6:161-170.
- Muñoz B., Sáenz M, Stefanova M., Pomas A., Díaz I. 2006. Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo del tabaco (*N. tabacum* L.). *Fitosanidad* 10 (2):153.
- Müller E. 1989. On the taxonomic position of *Septoria nodorum* and *Septoria tritici*. Third International Workshop on septoria diseases of Cereals Zurich Switzerland 4-7 de Julio 1989.
- Mumford J.D. & Norton G.A. 1984. Economics of decision making in pest management. *Annu. Rev. Entomol.* 29, 157-174.
- Munnecke D.E. 1972. Factors affecting the efficacy of fungicides in soil. *Ann. Rev. Phytopathol.* 10: 375-398.
- Murray M.G. & Thompson W.F. 1980 Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res* 8:4321–4325.
- Muthumeenakshi S., Mills P.R., Brown A.E., Seaby D. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology (Reading, England)*, 140 (Pt 4, 769–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7912144>.
- Narváez I. & Caldwell R.M. 1957. Inheritance of resistance to leaf blotch of wheat caused by *Septoria tritici*. *Phytopathology* 47: 529-530.

- Navazio L., Baldan B., Moscatiello R., Zuppini A., Woo S.L. 2007. Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biol.* 7:41.
- Navi S.S. & Bandyopadhyay R. 2002. Biological control fungal plant pathogens. *Plant pathologists` Pocketbook* (eds) Waller, M, Lenné and Waller, S.J. 354-365.
- Nico A., Mónaco C., Del Bello G., Alippi H. 2005. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: II Micoflora asociada y antagonismo in vitro de los aislados más frecuentes. *RIA.*;34 (Pt II)(1):29- 44.
- Nirenberg H.I. 1976. Untersuchungen über die morphologische undbiologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Landund Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 169:1–117.
- Ojito-Ramos K. & Portal O. 2010. Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnología Vegetal* 10 (1): 3–19.
- Páez O. 2006. Uso agrícola de *Trichoderma*. Disponible en: <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml> .
- Papavizas G.C., Lewis J.A., Abd-El Moity. 1982. *TH.harzianum* Evaluation of new biotypes of for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology*; 72: 126-132.
- Papavizas G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 23: 23–54.
- Parbery D.G. 1996. Trophism and the ecology of fungi associated with plants. *Biol. Rev.* 71: 473-527.
- Paredes N., Consolo F., Pancotto V., Fritz C., Arambarri A., Salerno G. 2013. Caracterización molecular de especies del género *Trichoderma* nativas de turberas compactas de *Astelia pumila* (Tierra del Fuego). 34° Jornadas de la Sociedad Argentina de Botánica. Sociedad Argentina de Botánica. La Plata, Argentina.
- Pastore M. 2009. Efecto de la fertilización nitrogenada y la aplicación de fungicidas sobre la severidad de la roya de la hoja, mancha de la hoja, mancha amarilla y el rendimiento en trigo. MSc. Thesis. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. 95 pp.
- Stocco, M.C. 2014

- Perelló A.E., Cordo C.A, Wolcan S., Sarandon S. 1988. Método simple para la obtención de inóculo de *Septoria tritici*. Rob. ex Desm. Nota en Revista de la Facultad de Agronomía La Plata 63: 91-94.
- Perelló A., Cordo C., Mónaco C. 1994. *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum*: antagonistic agents introduced to wheat phylloplane for biological control of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). Fourth International Workshop on *Septoria* of cereales. July 4-7. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzikow, Poland.
- Perelló A., Mónaco C., Cordo C. 1997. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* in controlling leaf blotch of wheat (*Septoria tritici*) under in Vitro and greenhouse conditions. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 104: 588-598.
- Perelló A., Simón M.R., Sisterna M., Cordo C., Arambarri A. 1998. Efecto de microorganismos saprófitos de filoplano del trigo en el control Biológico de patógenos foliares. Resúmenes del primer Congreso Argentino de control Biológico de Enfermedades de las plantas, INTA-UBA, 5 al 8 de octubre de 1998.
- Perelló A., Simón M.R., Cordo C., Sisterna M., Arambarri A.M. 2001. Microflora of wheat (*Triticum aestivum* L.) in Buenos Aires Province (Argentina) and its possible significance in the biological control of foliar pathogens. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 108: 123-132, Alemania.
- Perelló A., Simón M.R., Cordo C., Arambarri A.M. 2001a. Greenhouse screening of the saprophytic resident microflora for control leaf spots of wheat (*Triticum aestivum* L.) Phytoparasitica. Israel.
- Perelló A., Simón M., Arambarri A. 2002. Interactions between Foliar Pathogens and the Saprophytic Microflora of the Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phylloplane. Phytopathology 150: 232-243.
- Perelló A., Mónaco C., Sisterna M., Dal Bello G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for Tan Spot Wheat in Argentina. Crop Protection, 22: 1099-1106.
- Perelló A., Mónaco C., Moreno V., Simón M.R., Cordo C. 2004. Biocontrol de la mancha amarilla y mancha de la hoja del trigo con *Trichoderma* spp. bajo condiciones de campo. VI Congreso Nacional de Trigo. IV simposio Nacional de cultivos de siembra Otoño-invernal. Bahía Blanca 20-22 de Octubre de 2004. Ediciones INTA: P 205.

- Perelló A., Mónaco C., Moreno M.V., Cordo C., Simón M.R. 2006. The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. Koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina. *Biocontrol Science and Technology*, 16: 803-813.
- Perelló A. 2007. Enfermedades nuevas y emergentes en trigo. Manejo de bajo impacto ambiental con microorganismos antagonistas. Jornada de actualización en enfermedades de trigo. Libro de Resúmenes: 30-34. Lavallol Buenos Aires.
- Perelló A.E., Moreno M.V., Mónaco C., Simón M.R., Cordo C. 2008. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. *BioControl*, 54(1), 113–122.
- Perelló A., Mantz G., Dal Bello G. 2008 a. *Efecto de inductores biológicos y sintéticos sobre el manejo de la mancha amarilla. VII Congreso Nacional de Trigo. V Simposio Nacional de cereales de siembra Otoño-invierno. I encuentro del MERCOSUR. 2, 3y 4 de julio 2008 La Pampa Argentina.*
- Perelló A., Moreno V., Mónaco C., Simón M.R., Cordo C. 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch of wheat by *Trichoderma* spp under field conditions in Argentina. *BioControl* 54: 113-122.
- Perelló A. & Dal Bello G. 2011. Suppression of tan spot and plant growth promotion of wheat by synthetic and biologic inducers in field conditions. *Annals of Applied Biology* 158: 267-274.
- Pereyra S. & German S. 2012. Manejo de enfermedades en trigo y cebada en un contexto de márgenes reducidos, In Jornada Cultivos de Invierno, Mercedes, Soriano, UY). La Estanzuela, INIA Serie Actividades de Difusión no. (677), 15–25.
- Ponomarenko A., Goodwin S.B., Kema G.H.J. 2011. *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor*.
- Powell W., Morgante M., Andre C. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Prew R.D., Church B.M., Dewar A.M, Lacey J., Penny A., Plumb R.T., Thorne G.N., Todd A.D., Williams T.D. 1983. Effects of eight factors on the growth and nutrient uptake of

winter wheat and on the incidence of pests and diseases. *J.Agric. Sci. (Camb.)* 100: 363-382.

Quaedvlieg W., Kema G.H.J., Groenewald J.Z., Verkley G.J.M., Seifbarghi S., Razavi M., Crous P.W. 2011. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia*, 26, 57–69.

Rayner R. 1970. *A Mycological colour chart*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey & British Mycological Society.

Rehner S.A. & Samuels G.J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit rDNA sequences. *Mycological Research* 98: 625–634.

Reis E.M. 1994. *Manual de identificação e de quantificação de doenças do trigo*. Agrialpha . Passo Fundo, RS.

Reis E.M, Trezzi Casa R., Carmona M. 2002. Elementos para el Manejo de enfermedades. Pág 275- 308 en: *Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable*. Editor Sarandon, S. Argentina.

Reis E.M. & Carmona M.A. 2006. Bases para el manejo integrado de enfermedades en sistemas de siembra directa. En: AAPRESID (ed.) *14th Congreso AAPRESID, Rosario, Santa Fe, Argentina* 2006:11-26.

Reis E.M., Reis A.C., Carmona M., 2010. *Manual de fungicidas. Controle químico de doenças de plantas*. Editorial Universidade de Passo Fundo (ed.) Passo Fundo , Brasil.

Reis E.M. & Carmona M.A. 2011. Sensibilidad de razas de *Puccinia triticina* a fungicidas. En: Universidad de la República (ed.) *Actas del 2^{do} Simposio Nacional De Agricultura FAGRO - GTI Agricultura y IPNI Cono Sur*, Paysandu 2011: 89-94.

Rey M., Delgado-jarana J., Rincón A.M., Limón M.C. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev Iberoam Micol*, 17, 31–36.

Reyes Y., Martínez B., Infante D., García-Borrego J. 2009. Evaluación de la compatibilidad de *Trichoderma asperellum* Samuels con algunos de los herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz. XVII Congreso Científico del INCA, Nov.. San José de las Lajas, Habana, Cuba, 2009.

Rifai M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116:1-56.

- Rillo A.O. & Caldwell R.M. 1966. Inheritance of resistance to *Septoria tritici* in *Triticum aestivum* subsp. *vulgare*, Bulgaria 88 (Abstr.). *Phytopathology* 56: 897.
- Rodríguez H., Nass H., Cardona R., Alemán L. 1999. Alternativas para controlar el añublo de la vaina, causado por *Rhizoctonia solani* del arroz. *Fitopatología Venezolana*;12 (1):18.
- Rohlf F.J. 1998. NTSYS-PC version 2.0. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software: Setauket, NY.
- Rollán M., Nico A., Monaco C. 1999. Efecto de la temperatura sobre la interacción in vitro entre especies de "Trichoderma y Sclerotinia sclerotiorum, *S. minor* y *Sclerotium rolfsii*" *Investigación agraria. Producción y protección vegetales*, Vol. 14, Nº 1-2, págs. 33-48.
- Rosielle A.A. & Brown A.G.P. 1979. Inheritance, heritability and breeding behavior of three sources of resistance to *Septoria tritici* in wheat. *Euphytica* 28: 385-392.
- Rossmann A.Y. 2000. Towards monophyletic genera in the holomorphic *Hypocreales*. *Studies in Mycology* 45: 27–34.
- Royle D.J., Shaw M.W., Cook R.J. 1986. Patterns of development of *Septoria nodorum* and *S. tritici* in some winter wheat crops in Western Europe, 1981-83. *Plant Pathology* 35: 466-476.
- Royle D.J. 1994. Understanding and predicting epidemics: a commentary based on selected pathosystems. *Plant Pathology* 43: 777–89.
- Rubio M.B., Hermosa M.R., Keck E., Monte E. 2005. Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial ecology* 49(1): 25–33.
- Ruegger A. & Winzeler H. 1993. Performance of spelt (*Triticum spelta* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) at two different seeding rates and nitrogen levels under contrasting environmental conditions. *J. Agron. Crop Science* 170: 289-295.
- Saadaoui E.M. 1987. Physiologic specialization of *Septoria tritici* in Morocco. *Plant Disease* 71,153-S.
- Sahai A.S. & Manocha M.S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* 11, 317-338.

- Samuels G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* 100, 925-935.
- Samuels G.J. & Lodge D.J. 1996. Three species of *Hypocrea* with stipitate stromata and *Trichoderma anmorphs*. *Mycologia*, 88: 302-315.
- Samuels G.J., Petrini O., Kuhls K., Lieckfeldt E., Kubicek C.P. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Studies in Mycology* 41: 1–54.
- Samuels G.J., Dodd S.L., Gams W., Castlebury L.A., Petrini O. 2002 *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146–170.
- Samuels G.J. 2006. *Trichoderma*: Systematic, the sexual state, and Ecology. *Phytopathology*,96: 195-206.
- Samuels G.J, Dodd S., Lu B.S., Petrini O., Schroers H.J., Druzhinina I.S. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology* 56: 67–133.
- Samuels G.J., Chaverri P., Farr,D.F., McCray E.B. 2013. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved October 24, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.
- Sanderson F.R. 1972. A *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. *New Zealand Journal of Botany* 10,707-710.
- Sanderson F.R. 1976. *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Sanderson, comb. Nov. the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. *New Zealand Journal of Botany*14.
- Sanderson F.R., Scharen A.L., Scott. P.R. 1985. Sources and importance of primary infection and identities of associated propagules. In: AL. Scharen, ed. *Septoria of Cereals*. Memoria del taller celebrado del 2 al 4 de agosto de 1983, Bozeman, MT. USDA-ARS Publ. No. 12. Pp. 57-64.
- Sandoval I., Stefanova M., López M.O., Neyra M., García D. 1995. Utilización de un biopreparado de *Trichoderma* para el control de enfermedades en tomate y pimiento. (Resúmenes) Earth Conference on Biomass for Energy, Development and the Environment, La Habana Cuba, enero 10-15, p. 136-137.

- Sarandón S. 2002. La agricultura como actividad transformadora del ambiente. El impacto de la agricultura intensiva de la Revolución Verde. Pag 23- 48 en: Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable. Editor Sarandón, S. Argentina.
- Scharen A.L. & Krupinsky J.M. 1970. Cultural and inoculation studies of *Septoria nodorum*, cause of glume blotch of wheat. *Phytopatology* 60: 1480-1485.
- Scharen A.L. 1999. Biology of the *Septoria/Stagonospora* Pathogens: An overview. Eds van Ginkel, M., A. McNab, and J. Krupinsky. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. Mexico, D.F.: CIMMYT. 41-45.
- Schnieder F., Koch G., Jung C., Verreet J.A. 2001. Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph) *Septoria tritici* in Germany. *European Journal of Plant Pathology* 107: 285-290.
- Scott P.R., Sanderson F.R., Benedikz P.N. 1988. Occurrence of *Mycosphaerella graminicola* teleomorph of *Septoria tritici* on wheat debris in the UK. *Plant Pathology* 37: 285-290.
- Seaby D. 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathol.* 45: 905-912.
- Segarra C.I., Cordo C., Casalongué C.A., Conde R.D. 2000. Las proteasas apoplásticas de hojas de trigo inhiben la germinación de conidiosporas de *Septoria tritici* Reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular. SAIB 2000 .30 de octubre al 2 de noviembre de 2000. Viña del Mar. Chile.
- Segarra C. 2002. Actividades proteolíticas de hojas de trigo: su participación en la respuesta de defensa frente a la infección con el hongo *Septoria tritici*. Tesis Doctoral.
- Segarra C.I, Casalongue C.A., Pinedo M.L., Cordo C.A., Conde R.D. 2002. Changes in wheat leaf extracellular proteolytic activity after infection with *Septoria tritici*. *Phytopathology* 150:105-111.
- Segarra C., Mansilla Y., Casalongué C., Cordo C.A., Conde C. 2005. Wheat defense against the disease caused by *Septoria tritici*. The degradation of specific proteins of conidiospores by leaf extracellular proteases. 7th International Wheat Conference Abstrats. p 152 Mar del Plata, Argentina.
- Seidl V., Seibel C., Kubicek C.P., Schmoll M. 2009. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13909–13914
- Stocco, M.C. 2014

- Seifert K.A. & Samuels G.J. 1997. Two new hypocrealean fungi with synnematous anamorphs. *Mycologia* 89: 512–520.
- Shaner G. 1981. Effect of Environment on Fungal Leaf Blights of Small Grains. *Annual Reviews Phytopathol* 19: 273-296.
- Sharma K., Mishra A.K., Misra R.S. 2009. Morphological, biochemical and molecular characterization of trichoderma harzianun isolates for their efficacy as biocontrol agents. *Journal of Phytopathology* .157 (1): 51-56.
- Sharon E., Bar-Eyal M., Chet I., Herra- Estrella A., Kleifeld O., Spiegel Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91:687- 693.
- Shaw M.W. & Royle D.J. 1989. An epidemiologically based forecasting scheme for *Septoria tritici*. In: Friend, P.M. (ed.), *Proceeding Third International Workshop Septoria Diseases Cereales, Zurich, Switzerland*. 1989:189.
- Shipton W.A., Boyd W.J.R. Rosielle A.A., Shearer B.L. 1971. The common *Septoria* diseases of wheat. *Botanicat Review* 37, 231 62.
- Shoresh M., Harman G.E., Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48, 21–43.
- Simón M.R. & Cordo C.A. 1998. Diallel analysis of four resistance components to *Septoria tritici* in six crosses of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Breeding* 117: 123-126.
- Simón M.R., Perelló A.E., Cordo C.A., Struik P.C. 2002. Influence of septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) on yield, yield components and test weight of wheat under two nitrogen fertilisation conditions. *Crop Science* 42: 1974-1981.
- Simón M.R. 2003. Genetic, environmental and cultural factors influencing the resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat. PhD thesis Wageningen University. ISBN 90- 5808-912-6. 137 pp.
- Simón M.R., Cordo C.A., Perelló A.E., Struik P.C. 2003b. Influence of nitrogen supply on the susceptibility of wheat to *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology* 151: 283-289.

- Simón M.R., Worland C.A., Struik P.C. 2005 b. Chromosomal location of two genes encoding for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in seedlings and in the adult stage of wheat. *Neth. J. of Agr. Sci.* 53: 113-129.
- Simón M.R. 2007. Manejo integrado de enfermedades foliares fúngicas en trigo. Jornadas de actualización en enfermedades de trigo. Instituto Fitotécnico Santa Catalina. UNLP. pp. 40-45.
- Simón M.R., Cordo C., Castillo N.S., Struik P.C., Börner, A. 2012. Population Structure of *Mycosphaerella graminicola* and Location of Genes for Resistance to the Pathogen: Recent Advances in Argentina. *International Journal of Agronomy*, 2012, 1–7.
- Simón M.R., Annone J.G., Struik P.C. 2012 a. Management of Wheat Diseases. *International Journal of Agronomy*, 2012, 1–1.
- Sivasithamparizam K. & Ghisalberti E.L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium* pages 139-191 In: *Trichoderma and Gliocladium*. CP. Kubicek and GE. Harman, eds. Taylor & Francis Inc., Bristol, PA, U.S.A.
- Smith A.M. 1960. An introduction to industrial Mycology, pp.251-252.
- Smith A.M. 1976 Ethylene in soil biology. *Annu Rev Phytopathol*; 14:53-73.
- Sneath P.H.A. & Sokal R.R. 1973 Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. WH Freeman, San Francisco, CA.
- Sokal R.R. & Rohlf F.J. 1995. *Biometry*. 3^a ed. Freeman & Co. San Francisc.
- Somasco O.A., Qualset C.O., Gilchrist D.G. 1996. Single-gene resistance to septoria tritici blotch in the spring wheat cultivar 'Tadinia'. *Plant Breed* 115: 261-267.
- Spalding D.H. Bruehl G.W., Foster R.J. 1961, "Possible role of pectinolytic enzymes and polysaccharide in pathogenesis by *Cephalosporium gramineum* in wheat," *Phytopathology* 51: 227–235.
- Sprague R. 1934. A Physiologic form of *Septoria tritici* on oats. *Phytopathology* 24:133-143.
- Sprague R. 1950. Diseases of cereals and grasses in North America. The Ronald Press Co., New York.

- Stasz T.E., Nixon K., Harman G.E., Weeden N.F., Kuter A. 1989. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozyme poly- morphism. *Mycologia* 81:391–403.
- Stefanova M. 2007. Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. *Fitosanidad* 3: 75–79.
- St. Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. 1987. Production of cuticle- degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J Gen Microbiol* 133:1371–1382.
- Stenglein S.A. & Balatti P.A. 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiol Mol Plant Pathol* 68:158–167.
- Stewart S., Pereyra S., Diaz de Ackermann M. 2002. Manchas foliares de trigo y cebada bajo siembra directa: conceptos y estrategia de control. Informe 32 INIA. 30 pp.
- Stocco M., Mónaco C., Kripelz N., Segarra C., Lampugnani G., Abramoff C., Laporte G., Arteta N., Cordo C. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de la Septoriosis del trigo. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 30 de septiembre, 1 y 2 de octubre de 2009. Termas de Río Hondo. Santiago del Estero. Protección Vegetal Pp 89.
- Stocco M., Mónaco C., Cordo C. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianum* cultures. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27 (4): 213.
- Stocco M., Mónaco C., Lampugnani G., Abramoff C., Kripelz N., Laporte G., Segarra C., Consolo F., Cordo C. 2011. Banco Micológico de especies de *Trichoderma*. 2º Congreso Argentino de Fitopatología. 1, 2 y 3 de junio de 2011. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. P 392.
- Stocco M., Consolo F., Mónaco C., Kripelz N., Salerno G.L., Cordo C. 2012. “Control biológico de la mancha de la hoja del trigo con especies del género *Trichoderma*”. *Cereales de Invierno Segunda Jornada Temática del INBA “La investigación científico-técnica en cereales de Invierno”*. Universidad Nac del Centro, Bs As.288p.
- Stubbs R.W., Prescott J.M., Saari E.E., Dubin H.J.1986. Manual de metodología sobre las enfermedades de Cereales. CIMMYT Mexico.

- Sutton B.C. 1980. The coelomycetes. Fungi imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Sutton J. 1995. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. *Adv Plant Pathol.* 11:173–190.
- Tombetta E.E. & Nisi J.E. 1998. 100 Años del Trigo Argentino. Evolución del mejoramiento, calidad y producción. INTA. pp 96.
- Turner D., Kovacs W., Kuhls K., Lieckfeldt E., Peter B., Arsian-Atac I., Strauss J., Samuels G.J., Borner T., Kubicek C.P. 1997. Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. *Mycol Res* 101:449–459.
- Tye R. & Willetts A. 1977. Fungal Growth on C1 Compounds: Quantitative Aspects of Growth of a Methanol-Utilizing Strain of *Trichoderma lignorum* in Batch Culture. *Applied and environmental microbiology* 34(5): 615.
- Ulhoa C.J. 1996. Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. In: *Anais V sincobiol Simposio de controle biológico, Foz de Iguaçu, Parana, Brasil* 1996: 234-238.
- Ulloa M. & Hanlin R. 2006. Nuevo diccionario ilustrado de micología. Eds The American Phythopatological Society.
- Vargas W.A., Djonovic S., Sukno S.A., Kenerley C.M.. 2008. Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J. Biol. Chem.* 283:19804–15.
- Verreet J.A. 1995. Principles of integrated pest management. The IPM wheat model. Pflanzenschutznachrichten Bayer 48 Germany.
- Viterbo A., Haran S., Friesem D., Ramot O., Chet I. 2001. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiol Lett* 200, 169-174.
- Viterbo A., Montero M., Ramot O., Friesem D., Monte E., Llobell A., Chet I. 2002. Expression regulation of the endochitinase chit 36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr. Genet.* 42, 114–122.

- Waalwijk C., Koning J.R., Baayen R., Gams W. 1996. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia*, 88: 361-368.
- Walker Esponda, G.S. 2010. Perdurabilidad del efecto biocontrolador de dos cepas de *Trichoderma harzianum* (TH5 Y TH118) sobre la mancha de la hoja del trigo. Tesis de grado para acceder al título de Ingeniero Agrónomo.
- Watson A.G. & Ford E.J. 1972. Soil fungistasis-A reap- praisal. *Annu Rev Phytopathol*; 10:327-348.
- Weber G.F. 1922. II Septoria diseases of wheat. *Phytopathology* 12: 537- 585.
- Weber GF. 1923. III Septoria disease of rye, barley and certain grasses *Phytopathology* 13:1-23.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., New York., pp 315–322.
- Wiese M.V. & Ravenscroft A.V. 1973. Quantitative detection of propagules of *Cephalosporium gramineum* in soil. *Phytopathology* 63: 1198–1201.
- Wiest A., Grzegorski D., Xu B.W., Goulard C., Rebuffat S., Ebbole D.J., Bodo B., Kenerley C. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 20862-20868.
- Williams J.R. & Jones D.G. 1973. Infection of grasses by *Septoria nodorum* and *S. tritici*. *Trans. Sr. Mycol. Soc.* 60:355-358.
- Wilson R.E. 1985. Inheritance of resistance to *Septoria tritici* in Wheat. In: A.L. Scharen, ed. *Septoria of Cereals. Memoria del taller celebrado del 2 al 4 de agosto de 1983*, Bozeman, MT. USDA-ARS Publ. No. 12. Pp. 33-35.
- Wilson C.L., Wisniewski M.E., Biles C.L., McLaughlin R., Chalutz E., Droby S., 1991. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection* 10: 172-177.

- Woo S.L., Ciliento R., Piacenti D., Hermosa M.R., Scala F., Zoina A., Lorito M. 2001. Trichoderma chitinases and the encoding genes as molecular tools for enhancing biocontrol. En Chitin Enzymology. Muzzarelli, R. A. A. (ed). Atec edizioni, Grottammare, Italia, pp. 47-55.
- Woo S.L., Scala F., Ruocco M., Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96:181-185.
- Wuczowski M., Druzhinina I., Gherbawy Y., Klug B., Prillinger H.J., Kubicek C.P. 2003. Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiol. Res.* 158, 125–133.
- Yap I. V. & Nelson R. J. 1996. Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. *IRRI Discuss. Pap. Ser.* 14.
- Yechilevich-Auster M., Levi E., Eyal Z. 1983. Assessment of interactions between cultivated and wild wheats and *Septoria tritici*. *Phytopathology* 73: 1077-1083.
- Yedidia I., Benhamou N., Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1061-1070.
- Yedidia I., Srivastva A.K., Kapulnik Y., Chet I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants, 235–242.
- Yedidia I., Shores M., Kerem Z, Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. 2003. Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins. *Applied and Environmental microbiology* 69(12): 7343–7353.
- Zhang C., Druzhinina I., Kubicek C., Xu T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters.* 251 (2):251-257.
- Zheng Y. & Wozniak C.A. 1997. Adaptation of a β -1,3-glucanase assay to microplate format. *Biotechniques* 22(5):922-6.

Zimand G., Valinsky L., Elad Y., Chet I., Manualis S. 1994. Use of RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycol Res* 98:531–534.